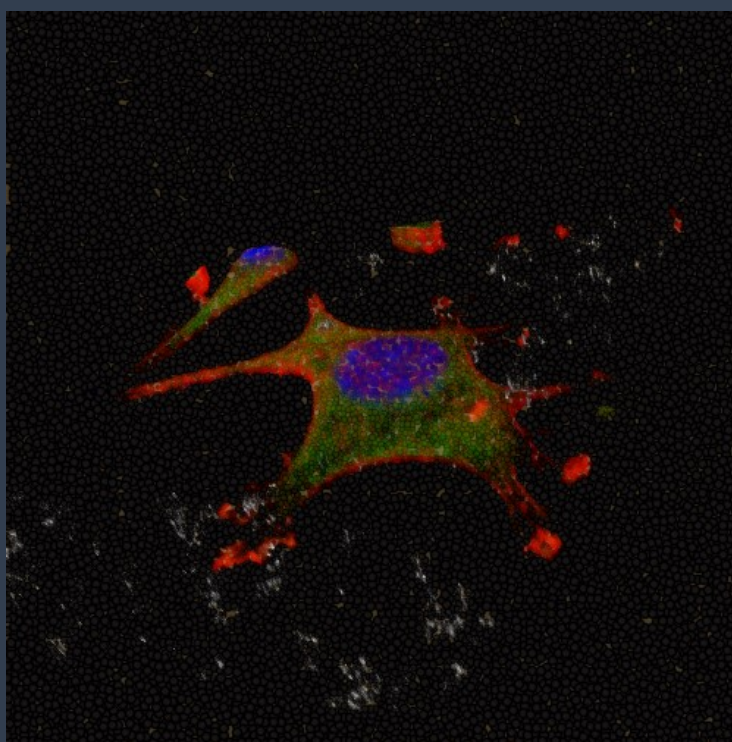


Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Bioactividad intrínseca de nanopartículas
magnéticas recubiertas con poli-etilénimina sobre
células tumorales pancreáticas y del sistema
fagocítico mononuclear**

Tesis Doctoral



Vladimir Mulens-Arias, MSc.

Madrid, 2015

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Bioactividad intrínseca de nanopartículas
magnéticas recubiertas con poli-etilénimina
sobre células tumorales pancreáticas y del
sistema fagocítico mononuclear**

Vladimir Mulens-Arias, MSc.

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Doctor en Ciencias

Director:

Domingo F. Barber Castaño, PhD

Centro Nacional de Biotecnología

Departamento de Inmunología y oncología

Madrid, España

2015

Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.

Robert Oppenheimer (1904-1967)

Agradecimientos

La vida del científico, o el que intenta serlo, es lo más parecido a la del ermitaño que no cesa de buscar la verdad donde quiera que esté. Y pareciera que cuanto más se anda, más se pierde el pasado. Pero, no es así. La suerte del ermitaño es la de hacer una familia en cada sitio que visita, no importa el tiempo transcurrido. Y a este ermitaño le ha tocado hacer en estas tierras de paellas y multiculturalidad la mejor de las familias. Una hermana mayor, esa que siempre he querido tener, Sonia, que me ha acompañado en mis años en Madrid con la paciencia de las que profesan cariño, y desean lo mejor para uno. A ella todo mi agradecimiento, admiración y cariño, de un hermano menor con el que podrá contar incondicionalmente dondequiera que esté, además, por darnos a ese pequeñín que considero mi sobrino y al que le deseo lo mejor en esta vida. A Raquelita que, aunque no estuvo todo este tiempo conmigo, por convertirse en esa suerte de hermana y rol profesional a seguir. Al indiscutible amigo y colega profesional, que no solo me ha enseñado lo agradable y placentero-aunque no exento de sinsabores-de la ciencia, sino también, ser una mejor persona, enseñándome que una buena sonrisa y carcajada, le alegra el día a cualquiera. A esa otra hermanita pequeña, que a lo mejor no lo vea así, pero yo sí, a Laura, que siempre me profesó una sonrisa hermosa que alegró mis días, y no dudó nunca en apoyarme. A Teresita, que aunque la vida quiso que apenas nos solapáramos en el tiempo, me mostró un cariño y amistad increíble. A ese loco italiano, Roberto, extraño donde los haya, que desde el primer día me apoyó. A Chiara, por ser tan excelente amiga y apoyarme en los momentos más difíciles. A Esthercita, por aguantarme con mis locuras transitorias y ser una excelente colega y amiga. A Laurita, Patricia, y Marina (la Sin Pa), que aunque no hemos compartido tanto, agradezco su apoyo. Por supuesto, a Domingo, que tuvo la bondad de acogerme y darme la oportunidad de seguir creciendo en este mundo difícil de la ciencia.

Quiero agradecer a María del Puerto Morales y su laboratorio por el apoyo profesional en el desarrollo de esta tesis. Y todos los que en el CNB me han apoyado. Especial mención,

a Carolina, Santa, y Paloma, las que siempre me alegraron el día en mis horas de desayuno y comida.

Pero como yo, hay otros ermitaños cubanos a los que agradezco su apoyo y tiempo compartido en esta ciudad encantadora: a Danny por ser una especie de *wing-man* en nuestras noches de disco y compartir días en el gym; a Nere por su indiscutible sabrosura e incondicional apoyo; a Araíz y Amaury, por compartir buenos momentos; a Alejo, por estar siempre allí para ayudarme; como también a Ileana y Michel por compartir excelentes momentos. Por supuesto, al Pepo, no solo por ser el más viejo de mis amigos y hermanos, sino por aguantarme como compañero de piso.

Quiero agradecer a esa familia que aunque no esté conmigo, siempre los llevo a donde vaya: A Yuniel (el cabeza), por apoyarme incondicionalmente y estar presente en mis momentos más aciagos; a Darién (el Gordo), por estar allí tan lejos como tan cerca, apoyándome en mis momentos más aciagos. A esa hermanita pequeña, Xitlally, que siempre estará presente en mis cosas.

A mi gran familia, en todos los sentidos, que por espacio no mencionaré, pero que tienen guardado en mí un espacio inconmensurable. Que siempre han estado y estarán apoyándome no importan las circunstancias, y que me adoran como hijo, sobrino, primo, padrino.

Y, en especial, a mi madre, donde quiera que esté, por darme todo lo que soy y seré.

Contenido	Página
RESUMEN/ABSTRACT	I
ABREVIATURAS	II
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nanomedicina en la terapia de patologías tumorales.....	1
1.2 Nanopartículas como plataformas terapéuticas.....	3
1.2.1 Sistemas nanoparticulados para terapia génica.....	3
1.2.2 Sistemas nanoparticulados para terapia génica.....	5
1.3 Interacción de nanopartículas con células tumorales	6
1.3.1 Endocitosis e internalización de nanomateriales	7
1.3.2 Efecto de nanopartículas en la proliferación de células tumorales	8
1.3.3 Efecto de nanopartículas en la migración/invasión de células tumorales	9
1.3.4 Estrés oxidativo y metabolismo del hierro inducido por SPIONs	11
1.4 Nanomedicina y su interacción con el sistema inmunológico	13
1.4.1 Sistema fagocítico mononuclear (SFM) y polarización de macrófagos	13
1.4.2 Polarización de macrófagos	14
1.4.3 Señalización por TLR4.....	16
1.4.4 Migración de macrófagos.....	17
1.4.5 Inmunogenicidad/Propiedades adyuvantes de nanomateriales Polímeros catiónicos como adyuvantes	18
1.4.6 Polímeros catiónicos como adyuvantes.....	19

1.4.7 Inmunogenicidad de nanomateriales inorgánicos	20
HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO.....	21
Hipótesis.....	21
Objetivos de trabajo.....	22

MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con PEI.....	23
2.2 Reactivos y anticuerpos.....	24
2.3 Cultivos celulares.....	25
2.4 Aislamiento de macrófagos peritoneales y esplenocitos de ratón.....	25
2.5 Ensayos de citotoxicidad.....	25
2.6 Conjugación con ADN y ensayos de transfección con pEGFP-N3.....	26
2.7 Conjugación con ARN interferentes y ensayos de silenciamiento de Bcl-2.....	26
2.8 Estudio de rutas de endocitosis.....	27
2.9 Activación de macrófagos y esplenocitos.....	28
2.10 Tratamiento de la línea murina de carcinoma pancreático, Pan02.....	28
2.11 Determinación de EROs.....	28
2.12 Western-blots.....	28

2.13 ELISAs.....	29
2.14 PCR semi-cuantitativa.....	30
2.15 Estudio de IRP2.....	35
2.16 Estudio de marcadores de activación por citometría.....	36
2.17 Estudio de podosomas e invadosomas.....	36
2.18 Ensayos de degradación de gelatinas.....	38
2.19 Ensayos de cierre de herida.....	38
2.20 Ensayos de degradación de membrana basal intestinal murina.....	39

RESULTADOS.....	41
3.1 Síntesis química y caracterización química-física de las nanopartículas.....	41
3.2 Citotoxicidad y eficiencia de transfección.....	46
3.2.1 Citotoxicidad contra líneas tumorales.....	46
3.2.2 Internalización y eficiencia de transfección.....	48
3.3 Bioactividad intrínseca en células tumorales (Pan02).....	57
3.3.1 Las PMags activan la respuesta anti-estrés oxidativo y del metabolismo del hierro..	57
3.3.2 Las PMags no afectan la capacidad proliferativa de las células tumorales pancreáticas.....	60
3.3.3 Las PMags inhiben la migración/invasión de las células tumorales pancreáticas.....	63
3.3.4 Las PMags modulan la dinámica de formación de invadosomas en células tumorales pancreáticas.....	66

3.3.5 Las PMags modulan la señalización dependiente del oncomiR microARN-21.....	67
3.3.6 Las PMags inhiben la degradación de la matriz extracelular.....	70
3.3.7 Las PMags afectan la expresión de genes vinculados a la migración/invasión.....	73
3.3.8 Las PMags inhiben la activación de la quinasa Src y la expresión de las metaloproteinasas MT1-MMP y MMP2.....	74
3.3.9 Las PMags modulan la expresión de genes respondedores a NF-κB.....	76
3.3.10 Las PMags regulan la señalización a través de NOTCH1.....	77
3.4 Bioactividad intrínseca en células endoteliales (SVEC4-10) y fibroblastos (NIH3T3).....	78
3.5 Bioactividad intrínseca en células del sistema fagocítico mononuclear (SFM).....	84
3.5.1 Las PMags inducen la secreción de IL-12p70 e IL-10 por macrófagos.....	84
3.5.2 Las inducen un perfil de expresión génica de activación en macrófagos RAW264.7 pero difieren del inducido por LPS.....	87
3.5.3 Las PMags activan a las MAPKs.....	90
3.5.4 Las PMags incrementan el metabolismo del hierro.....	91
3.5.5 La activación de macrófagos RAW264.7 por PMags depende parcialmente de TLR4 y EROs.....	93
3.5.6 Las PMags modulan la dinámica de podosomas en los macrófagos RAW264.7.....	95

DISCUSIÓN.....	101
Nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenimina como agentes transfectantes.....	101

Bioactividad intrínseca sobre células Pan02.....	102
Bioactividad intrínseca sobre células endoteliales y fibroblastos.....	111
Bioactividad intrínseca sobre células del sistema fagocítico mononuclear; propiedades adyuvantes.....	112
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	119
5.1 Conclusiones.....	119
5.2 Recomendaciones.....	121
ANEXO I. Artículos científicos asociados con la presente tesis doctoral.....	122
ANEXO II. Artículos científicos no asociados con la presente tesis doctoral.....	123
BIBLIOGRAFÍA.....	127

Resumen

La nanotecnología ha significado un considerable salto para aplicaciones biomédicas, debido a las propiedades químico-físicas intrínsecas de los biomateriales, y a la posibilidad de modificarlos de acuerdo a los intereses terapéuticos y diagnósticos específicos. Particularmente, las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) son ampliamente explotadas por sus propiedades magnéticas, no solo en estrategias diagnósticas como agentes de contraste, sino también, como nanotransportadores de drogas. La posibilidad de concentrar estas nanopartículas en el sitio de interés mediante la aplicación de campo magnético externo aporta otra vía para disminuir los efectos secundarios sistémicos de muchas de las actuales drogas anti-tumorales. Entre las terapias anti-tumorales en las que se han utilizado las nanopartículas está la terapia génica. Para funcionalizar las nanopartículas para transportar ADN/ARN, se han desarrollado diferentes polímeros catiónicos con la capacidad de conjugar ADN y/o ARN, garantizando su estabilidad química y funcional ante las diferentes condiciones fisiológicas (torrente sanguíneo, microambiente tumoral, compartimento endosomal, etc.). Sin embargo, un aspecto importante es la interacción de las propias nanopartículas magnéticas con diferentes sistemas celulares como el sistema fagocítico mononuclear, células endoteliales, fibroblastos, y las propias células tumorales, que eventualmente podría definir la eficacia del tratamiento.

En este trabajo, estudiamos la interacción de SPION recubiertas con polietilenimina (PEI) desnudas con macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, y células tumorales murinas de páncreas. Demostramos que, además de poseer la capacidad de transfectar eficientemente (células HEK293), las SPIONs recubiertas con PEI inhiben la migración e invasión de las células tumorales murinas pancreáticas a través de la disminución de invadosomas y metaloproteinasas, MT1-MMP y MMP2, así como, probablemente, mediante la modulación de la ruta dependiente de microARN-21. Igualmente, estudiamos el efecto biológico que estas nanopartículas tienen sobre células endoteliales y fibroblastos, en los que induce la expresión de genes vinculados con procesos biológicos como la angiogénesis y respuesta inmune, así como inhiben la migración de las células endoteliales. Finalmente, demostramos que las SPIONs activan los macrófagos hacia un fenotipo M1 y modulan la dinámica de formación de podosomas. Además, inhiben la degradación de matriz extracelular por los macrófagos a través de la expresión de inhibidores de metaloproteinasas y la modulación de MMP2. En resumen, estos resultados demuestran que las SPIONs recubiertas con PEI no solo son un agente transfectante, sino también, poseen en sí mismas propiedades anti-metastásica y adyuvantes independientes de la capacidad de transfección, lo que sugiere su uso en estrategias anti-tumorales e inmunoterapéuticas.

Palabras claves: nanopartículas, activación de macrófagos, células tumorales, migración, invasión

Abstract

Nanotechnology has meant a considerable jump for biomedical applications, due to the intrinsic chemical and physical properties of biomaterials, and the possibility to modify them for specific diagnostic and therapeutic interest. Particularly, the superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) are widely exploited for their magnetic properties, not only in diagnostic strategies as contrast agents, but also as drug nanocarriers. The ability to concentrate these nanoparticles at the site of interest by applying external magnetic field provides another way to reduce systemic side effects of current anti-tumor drugs. Gene therapy is among the anti-tumor therapies in which the nanoparticles have been used. In this sense, different cationic polymers have been developed with the ability to package DNA and / or RNA, thereby preserving their chemical and functional stability in different physiological conditions (bloodstream, tumor microenvironment, endosomal compartment, etc.). However, an important consideration is the interaction of the magnetic nanoparticles themselves with cellular systems, *e.g.* the mononuclear phagocyte system, endothelial cells, fibroblasts and the tumor cells themselves, which could eventually influence the efficacy of treatment.

In this study, we analyzed the interaction of naked polyethyleneimine (PEI)-coated SPIONs with macrophages, fibroblasts, endothelial cells, and murine pancreatic tumor cells. We showed that, besides having the ability to efficiently transfect (HEK293 cells), PEI-coated SPIONs inhibit migration and invasion of murine pancreatic tumor cells by decreasing invadosomes and metalloproteinases MT1-MMP and MMP2 and, likely by modulating the microRNA-21-dependent pathways. Also we studied the biological effects on endothelial cells and fibroblasts, where they induce the expression of genes linked to biological processes, *e.g.* angiogenesis and immune response, and inhibit migration of endothelial cells. Finally, we showed that PEI-coated SPIONs activate macrophages (M1 like phenotype) and modulate podosome dynamics. Also, they inhibited the degradation of extracellular matrix by macrophages through the metalloproteinase expression inhibition (MMP2) and induction of metalloproteinase inhibitors. In summary, these results demonstrate that the PEI-coated SPIONs are not only able to efficiently transfect cells, but also exert potential anti-metastatic and adjuvant properties themselves, independently of transfection capacity, suggesting their use in anti-tumor and immunotherapeutic strategies.

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ADN</i>	Ácido desoxorribonucleico
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>ARNi</i>	Ácido ribonucleico interferente
<i>BHA</i>	Butil-hidroxianisol
<i>CPA</i>	Células Presentadoras de Antígeno
<i>DC</i>	Del inglés, dendritic cell
<i>DLS</i>	Del inglés, dynamic light scattering
<i>DPI</i>	Del inglés, Diphenyleneiodonium chloride
<i>ELISA</i>	Del inglés, enzyme-linked immunoassay
<i>ERK</i>	Del inglés, extracellular signaling-regulated kinase
<i>ERO</i>	Especies Reactivas del Oxígeno
<i>GFP</i>	Del inglés, Green Fluorescent Protein
<i>K_D</i>	Constante de disociación
<i>LPS</i>	Lipopolasacárido

Abreviatura	Término
<i>M1/M2</i>	Macrófago fenotipo 1 ó 2
<i>MAPK</i>	Del inglés, mitogen-activated protein kinase
<i>PCR</i>	Del inglés, polymerase chain reaction
<i>PDCD4</i>	Del inglés, programmed cell death protein-4
<i>PEG</i>	Poli-etilenglicol
<i>pEGFP</i>	Plásmido codificante para GFP
<i>PEI</i>	Poli-etilénimina
<i>PMag</i>	SPION recubierta con polietilenimina
<i>PTEN</i>	Del inglés, phosphatase and tensin homolog
<i>SFM</i>	Sistema Fagocítico Mononuclear
SPION	Del inglés, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
<i>TA</i>	Temperatura ambiente
<i>T_H1</i>	Del inglés, T helper type 1
<i>T_H2</i>	Del inglés, T helper type 2
<i>TLR</i>	Del inglés, Toll-like receptor

Introducción

1.1 Nanomedicina¹ en la terapia de patología tumorales

El uso de la nanotecnología está ampliamente extendido en varios campos de la biomedicina debido a su potencial como sistemas para la liberación controlada de drogas terapéuticas [1-4], como agentes diagnósticos [5-8], y biosensores [9-11], entre otras aplicaciones. La utilización de la nanotecnología se basa en la combinación de propiedades físicas distintivas (procesos ópticos, electrónicos, y comportamientos magnéticos) con las propiedades químicas provenientes de las capas moleculares funcionalizadas. Estas propiedades dependen, en gran medida, de dos características principales: el gran área superficial y las propiedades físicas derivadas de la escala nanométrica de los sistemas nanotecnológicos. Por otra parte, las nanopartículas usualmente son recubiertas con polímeros u otras capas moleculares que proporcionan al sistema funciones adicionales [12, 13].

Una propiedad física de los sistemas nanoparticulados, específicamente de los de núcleo de óxidos metálicos, que en la última década ha llamado la atención para su uso en la biomedicina tumoral, es el magnetismo, especialmente el superparamagnetismo [14, 15]. Las nanopartículas magnéticas son aplicadas tanto como agentes terapéuticos como de diagnósticos, por ejemplo en imágenes de resonancia magnética (*MRI* del inglés, *magnetic resonance image*) [16-18]. Sin embargo, las nanopartículas superparamagnéticas, **SPIONs**², deben ser capaces de evadir al sistema inmune y así ralentizar su eliminación de los fluidos biológicos. Las SPIONs son eliminadas de la circulación mayormente a través del

¹ **Nanomedicina (del inglés, nanomedicine)**: aplicación de la nanotecnología a la medicina.

² **SPIONs**: del inglés Superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

² **SPIONs**: del inglés Superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

sistema retículo-endotelial (SRE), y mecanismos renales de filtración [19-23] (*Figura I-1*). Un factor que influye en la eliminación de las nanopartículas es su tamaño hidrodinámico. En general, las partículas entre 10 y 100 nm de diámetro muestran un mayor tiempo de circulación ; por el contrario, partículas de 200 nm o más tienden a ser eliminadas por SRE, y aquellas con menos de 10 nm por filtración renal [24].

El tamaño de la nanopartículas también afecta su habilidad para extravasar desde la circulación sanguínea al tejido tumoral, a través del proceso de transcitosis [25, 26]. Este proceso depende del tamaño de las partículas, con un máximo límite de aproximadamente 150 nm de diámetro. Otro importante factor es la composición química de la superficie del sistema nanoparticulado [27]. Por ejemplo, alta densidad de cargas positivas superficiales permite la adhesión de las nanopartículas a las membranas plasmáticas de manera no específica, en tanto, una alta densidad de cargas negativas conlleva a la adsorción de proteínas plasmáticas, y, de esta manera, a la endocitosis y eliminación por el **SRE**³ [27, 28]. Incluso, la interacción de las proteínas plasmáticas con las nanopartículas con carga superficial positiva y negativa, induce distintos efectos biológicos [29]. Las superficies hidrofílicas y neutras reducen la capacidad de las nanopartículas de interaccionar con las proteínas de la sangre o células [30].

La terapia pasiva del cáncer basada en nanopartículas depende de la alta permeabilidad vascular del tejido tumoral. La desorganizada, permeable, y desestructurada vasculatura tumoral posibilita que las nanopartículas permeen al microambiente tumoral [31-33]. Una vez dentro, son retenidas debido a la pobremente desarrollada red linfática que irriga el tumor: este fenómeno es conocido como **efecto de retención y permeabilización aumentada (EPR)**⁴ (*Figura I-1*). La alta retención permite la adquisición de la nanopartículas por las células tumorales y estromales circundantes, incluyendo las células del sistema inmunológico [34].

³ **Sistema Retículo-Endotelial:** también conocido como sistema de macrófagos o fagocítico mononuclear, incluye células ampliamente distribuidas por el organismo y especializadas en la captación de partículas. Constituyen parte de los mecanismos de defensa.

⁴ **EPR**, del inglés *Enhanced Permeability and Retention Effect*

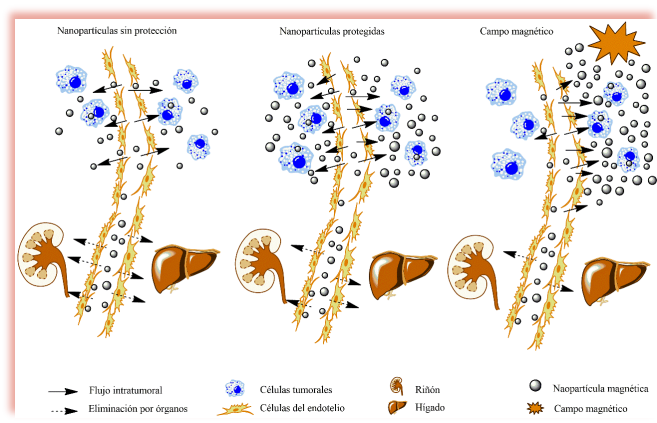


Figura I-1. Efecto de permeabilidad y retención en el contexto de terapia anti-tumoral basada en nanopartículas magnéticas. Debido a la debilitada vasculatura tumoral, las nanopartículas son capaces de permear el microambiente tumoral,

aunque la eliminación por órganos y el sistema retículo-endotelial (SRE) elimina la mayor parte de ellas. El recubrimiento con polímero y/o moléculas funcionales proporcionan a las nanopartículas con indetectabilidad y especificidad, y, consecuentemente, capacidad de evasión del SRE; como resultado, se acumulan en el tejido tumoral. Con la aplicación de un campo magnético externo, la acumulación de nanopartículas magnéticas en el tejido tumoral aumenta significativamente (Modificado de [35]).

Otras estrategias se han usado para aportar a las nanopartículas la indetectabilidad. Por ejemplo, variando la proporción de polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos sin cambios ni en el tamaño, ni la carga, ni en la composición del núcleo de micelas auto-ensambladas espontáneamente, disminuye su eliminación por el SRE [36]. Cuando se siguieron *in vivo*, algunas de estas micelas se acumularon menos en tejido hepático, mientras que se concentraron más en la sangre a la hora de la inyección intravenosa, comparado con micelas **PEGuiladas**⁵ [36].

1.2 Nanopartículas como plataforma terapéutica

1.2.1 Sistemas nanoparticulados para terapia génica

Aparte de las propiedades superparamagnéticas de los SPIONs, otras propiedades importantes deben estar presentes en estos sistemas para la liberación apropiada del fármaco. Para el caso de la terapia génica, los polímeros que encapsulan los núcleos de óxido de hierro, deben ser reactivos a los ácidos nucleicos y poseer una carga positiva que

⁵ **PEGuilar**: modificar químicamente con brazos moleculares de poli-etilén glicol.

posibilite la conjugación electrostática. Alternativamente, tanto los ácidos nucleicos como los polímeros deben ser modificados químicamente de tal forma que puedan conjugarse covalentemente entre ellos. Aunque ambas estrategias se han utilizado, la conjugación electrostática es preferida porque no modifica la integridad del ácido nucleico.

Una vez que el ADN⁶/ARN⁷ sea encapsulado o adsorbido por el SPION, el nanocomplejo tiene que garantizar la estabilidad e integridad del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos son muy lábiles en el torrente sanguíneo y en el microambiente tisular, debido a la presencia de nucleasas que reconocen los residuos 2-hidroxi del anillo de azúcar y catalizan su hidrólisis [37]. La endocitosis por las células también juega un papel importante en la eliminación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en el tejido hepático [38]. Adicionalmente, la encapsulación debe impedir el reconocimiento por parte de TLR⁸-7/8 [39] y, así, evitar una respuesta inmune contra las nanopartículas que conlleve a su eliminación más temprana de la circulación.

Una vez en el tejido tumoral, las nanopartículas deben permear la matriz tumoral. En este entorno, el polímero ha de proteger a los ácidos nucleicos del microambiente ácido que frecuentemente rodea a las células tumorales [40, 41]. Subsecuentemente, las células tumorales deben endocitar los nanoparticulados, que, una vez dentro, deben escapar a la degradación lisosomal para así liberar apropiadamente el cargamento en el citosol.

Los problemas actuales con la terapia génica en cáncer están asociados con la poca expresión del gen en cuestión, si se busca su sobre-expresión, o la poca eficiencia de silenciamiento si se busca eliminarlo, todo debido a las barreras biológicas descritas anteriormente [42, 43]. Se han desarrollado una variedad de polímeros para uso en terapias génicas, en las modificaciones químicas aumentan la eficiencia de transfección *in*

⁶ ADN: ácido desoxirribonucleico

⁷ ARN: ácido ribonucleico

⁸ TLR, del inglés *Toll-like receptor*: familia de receptores especializados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.

vitro e *in vivo*, siendo la **polietilenimina (PEI)**⁹, uno de los polímeros más usados como agente de transfección [44, 45].

1.2.2 *Sistemas nanoparticulados magnéticos para terapia génica*¹⁰ *contra el cáncer*

La acumulación de nanopartículas magnéticas mediante la aplicación de un campo magnético ha posibilitado su uso como agente transportador en las terapias génicas. No solo pueden proteger el cargamento de ácido nucleico, sino también lo pueden liberar apropiadamente en las células dianas, aportando de esta forma soluciones a los principales problemas que afronta la terapia génica. Desde que las nanopartículas magnéticas han sido propuestas como agente transfectantes no virales [35, 46, 47], la **magnetofección**¹¹ se ha estudiado ampliamente en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Nanopartículas magnéticas recubiertas con el co-polímero PEG-g-PEI conforman nanotransportadores factibles para la Imagenología de Resonancia Magnética (MRI) *in vivo* para pulmones e hígado [48]. Estos nanocomplejos liberaron intracelularmente ARNi contra la variante 6 del CD44, un marcador supuesto del comportamiento metastásico de tumores gástricos, en la línea SCG-7901. Sin embargo, cuando se estudiaron en ratones desnudos portadores de tumores derivados de SCG-7901 y A375, no fueron capaces de infiltrar el tejido tumoral adecuadamente [48].

El nanotransportador magnético, disponible comercialmente, CombiMAG, ha sido igualmente probado como agente liberador de ácidos nucleicos. Kong et al [49, 50] demostraron que el magnetoplejo, nanocomplejo con propiedades magnéticas (del inglés *magnetoplex*), compuesto por CombiMAG y ARNi específico para IGF-1R, eficientemente liberó el contenido genético en células A549 *in vitro*, con la inhibición de la proliferación, adhesión, y quimioresistencia. Conjugado con el plásmido pGFPshIGRR1 que conlleva a la expresión concomitante de GFP y un ARNi específico contra IGFR1, e inyectado en

⁹ **Poli-etilénimina, PEI** (del inglés, *polyethylenimine*) es un polímero catiónico formado por la polimerización lineal o ramificada de la etilénimina.

¹⁰ **Terapia génica:** inserción o eliminación terapéutica de genes funcionales o su transcrito.

¹¹ **Magnetofección, del inglés *magnetofection*:** transfección celular con nanopartículas magnéticas y guiada por campo magnético externo.

ratones intravenosamente, condicionó la expresión de GFP a las 48 h post-inyección en corazón, riñones, y pulmones, con la disminución simultánea de IGFR1 [51].

Mok et al [52] desarrollaron un nanosistema magnético compuesto por PEI ramificada y sensible a pH ácidos para explotar el pH normalmente bajo del microambiente tumoral. Una vez conjugados con el péptido específico de tumor, clorotoxina, y un ARNi contra la GFP, demostró ser capaz de silenciar la expresión de esta proteína; adicionalmente, demostró ser altamente sensible y dependiente de las condiciones ácidas de los tumores. Similar eficiencia demostró el LipoMag, compuesto por un núcleo de magnetita rodeado por una membrana lipídica y utilizado como nanotransportador de un ARNi contra EGFR [53]. En resumen, la terapia génica con SPION basada en la combinación de núcleos magnéticos de óxido de hierro con polímeros o capas moleculares protectoras de ADN/ARN ha demostrado ser una estrategia prometedora.

1.3 *Interacción de nanopartículas con células tumorales*

Las nanopartículas se han utilizado para el tratamiento experimental del cáncer, no solo en terapias génicas como ha sido discutido anteriormente, sino también como nanotransportadores y liberadores de distintas drogas. En este sentido, se han desarrollado varias formulaciones con contenido de SPIONs con propósitos tanto diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, las micelas denominadas SPION-doxorubicina-cRGD consisten en un grupo de SPIONs co-existentes con la droga doxorubicina y el ligando cRGD, y su uso no solo es diagnóstico debido a la presencia de SPIONs, sino también terapéutico debido a la presencia de la droga [54]. Otras drogas anti-tumorales se han conjugado con nanopartículas y probados en modelos tumorales. Tal es el caso de paclitaxel (PTX) [55], que combinado con anticuerpos específicos contra antígenos específicos de próstata demostró alta capacidad diagnóstico y terapéutico [56]; gemcitabina [57], e incluso citoquinas con el objetivo de modular la inmunidad anti-tumoral [58].

Sin embargo, la eficacia de los tratamientos con tumores basados en nanopartículas no solo depende de la droga que portan, sino también de las propiedades intrínsecas de los

nanotransportadores y cómo estos interactúan con las células tumorales: modo de internalización; efectos sobre la proliferación, migración, metabolismo, y el estrés inducido.

1.3.1 Endocitosis e internalización de nanomateriales

La endocitosis es un proceso celular dependiente de energía por el cual la célula internaliza molécula y macromoléculas. Puede dividirse en cuatro categorías principales: (1) dependiente de clatrina; (2) dependiente de caveola; (3) macropinocitosis; (4) y fagocitosis (**Figura I-2**). El proceso de endocitosis dependiente de clatrina comienza con la formación de invaginaciones de la membrana plasmática recubiertas por clatrina, ayudado por varias proteínas adaptadoras como la epsina, SNX9, y amfifisina [59, 60]. Las proteínas con dominio BAR (del inglés, *Bin/amphiphysin/Rvs domain*) promueven el reclutamiento de dinamina, con la que forman el cuello de vesícula. A continuación, la dinamina induce la escisión de la vesícula formada con ayuda de su función GTPasa. Posteriormente, la vesícula recubierta de clatrina pierde su capa de clatrina polimerizada con ayuda de las proteínas auxilina y Hsc70, dependientes de ATP [61, 62].

Una de las rutas más importantes de endocitosis independiente de clatrina, es la asociada a la caveolina [63]. Esta proteína, que está compuesta por tres tipos diferentes con las caveolina-2 y -3 ampliamente distribuidas, enriquece a las llamadas caveolas, estructuras ricas además en colesterol, y con inicio de biogénesis en el complejo de Golgi [64].

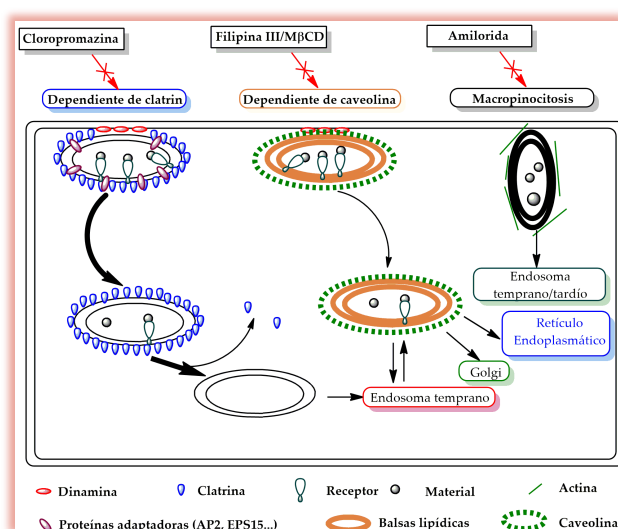


Figura I-2. Rutas de endocitosis e inhibidores específicos.

Otras rutas de endocitosis son requeridas para la internalización de materiales de mayor tamaño como patógenos, cuerpos apoptóticos o necróticos, o micromateriales (*Figura I-2*). Entre ellas se encuentra la macropinocitosis, cuya estructura de invaginación es ampliamente plegada.

A lo largo de los últimos años se han dilucidado las vías endocíticas para muchos materiales terapéuticos nanométricos [65-67]. Notablemente, el tipo de ruta de endocitosis no solo parece depender de las propiedades físico-químicas del nanomaterial, sino también influyen en la posible citotoxicidad inducida por estos materiales [68].

De lo anterior se desprende la importancia de la ruta de internalización para las consecuencias fisiológicas del tratamiento con nanomateriales. Y, particularmente, este fenómeno influye notablemente en los procesos de transfección celular. Aunque, se ha determinado que muchos conjugados entre agentes de transfección catiónico (como PEI) y ADN/ARN dependen de las rutas mediada por caveolas y clatrina para su internalización en diversos sistemas celulares [69], la endocitosis dependiente de caveolina parece jugar un papel más crucial en la transfección.

1.3.2 *Efecto de nanopartículas en la proliferación de células tumorales*

Las nanopartículas pueden tener diferentes efectos sobre la capacidad proliferativa de las células tumorales. Las nanopartículas de poliestireno cationizadas con grupo aminos inducen a dosis no tóxicas una gradual inhibición del ciclo celular de las células tumorales del epitelio pulmonar, A541, a través del arresto de los puntos G1/S y G2/M del ciclo celular. Interesantemente, este efecto no lo mostraron las nanopartículas de poliestireno con grupos carboxilo ni las no modificadas [70]. Igualmente, la hidroxiapatita nanométrica, a diferencia de la de mayor tamaño, es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales humanas presumiblemente a través de la interferencia del complejo ribosomal con la consecuente parada del ciclo celular en G0/G1 [71]. Similar efecto se observó en células tumorales humanas de cabeza y cuello, en las que el tratamiento con SPION recubiertas con dextrano inhibió su proliferación dependiente de la concentración de las nanopartículas [72].

Por lo tanto, es vital entender el efecto que las nanopartículas desnudas y las que se usan como nano-transportadores de drogas tienen sobre la capacidad proliferativa de las células, en particular, las células tumorales para evitar efectos secundarios indeseables en el tratamiento del cáncer con estas plataformas.

1.3.3 *Efecto de nanopartículas en la migración/invasión de células tumorales*

Notablemente, las nanopartículas inorgánicas, incluyendo SPIONs, pueden imposibilitar la migración celular dependiendo de la concentración [73-75]. Este efecto podría depender del tipo celular así como de la carga superficial y forma de las nanopartículas [76]. Varios parámetros pueden verse afectados por el tratamiento con nanopartículas que conlleva a la muerte o inmovilidad celular, incluyendo la disminución de la expresión de factores involucrados en la invasión tumoral e, indirectamente, otros procesos celulares como la respiración mitocondrial que a la postre afecta la dinámica del cito-esqueleto y la dinámica de los invadosomas [77].

Los invadosomas o invadopodias son estructuras ricas en actina que concertan la migración de las células tumorales, con similitudes estructurales y funcionales con los podosomas [78, 79] (*Figura I-3*). Los invadosomas normalmente se asocian con la motilidad de las células tumorales como un proceso prestado y desregulado a partir de células normales [80, 81]. Estas estructuras pueden diferenciarse de los podosomas de acuerdo a la morfología global, puesto que muestran estructuras filamentosas que protruyen más en la **matriz extracelular (MEC¹²)** permitiendo así a las células ejercer más actividad degradativa y capacidad invasiva [82, 83]. Por lo que, la actividad degradativa de los invadosomas se asocia al potencial pro-metastásico de las células tumorales [82, 84, 85].

¹² **Matriz extracelular (MEC):** Compendio de moléculas secretadas por células que proveen soporte biológico y estructural al conjunto multicelular en el microambiente tisular. Su composición incluye desde proteoglicanos, ácido hialurónico, componentes de fibra como colágenos y elastina, hasta fibronectina y laminina. Su composición varía de acuerdo a los tipos celulares contribuyentes.

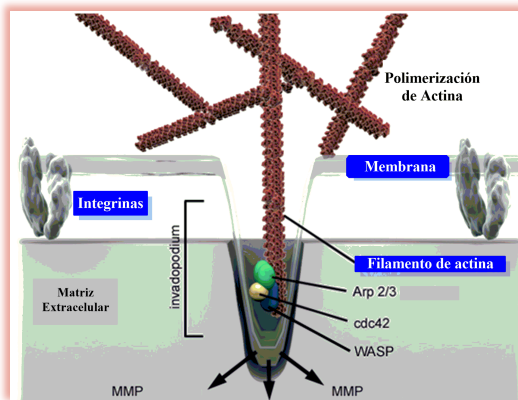


Figura I-3. Estructura simplificada de un invadosoma o invadopodia.

Los invadosomas contienen una variedad de proteínas involucradas no solo en ensamblaje, como nucleadores de actina y proteínas de andamiaje, sino también, reguladoras, como quinasas y fosfatasa, así como enzimas responsables de la degradación de la MEC como metaloproteinasas, proteasas catepsina Cys, y proteasas de Ser [86, 87].

En las células tumorales del páncreas, los invadosomas juegan un papel primordial en la alta capacidad invasiva de las mismas [88]. La formación de estas protrusiones en las células tumorales del páncreas está regulado por varios factores como Vav1 [89], Dinamina-1 [90], RalBP1 [91], entre otros.

La migración/invasión celular está modulada por varios ejes de señalización a través del control de factores centrales involucrados en el inicio, progresión y término del movimiento mecánico. Entre estos ejes, el dependiente de microARN-21 juega un papel importante en la regulación de varias proteínas involucradas en los procesos de migración de células tumorales [92, 93]. De hecho, microARN-21 modula positivamente la migración celular a través de tres de sus dianas naturales, PDCD4 [94, 95], PTEN [96], y Sprouty-1[97]. MicroARN-21 es un **oncomiR**¹³ implicado en la regulación de varias rutas de señalización (*Figura I-4*) [98]. Incluso, la mayoría de los tipos de cáncer sobreexpresan este microARN, siendo la causa de la disregulación de las rutas de proliferación y anti-apoptóticas, reduciendo la expresión no solo de las tres proteínas antes mencionadas, sino también, de Bcl-2 [99].

¹³ **OncomiR**: microARN asociado a procesos tumorigénicos.

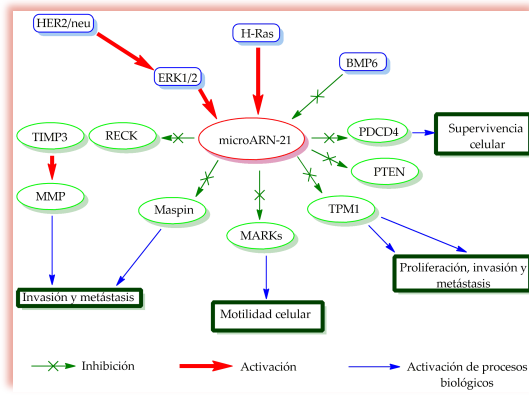


Figura I-4. Interrelación funcional del microARN-21 con diversos procesos biológicos en células tumorales. La expresión del microARN-21 está regulada positiva y negativamente por varios factores. Como resultado se activan varios procesos biológicos. Abreviaturas: BMP, proteína morfogénica del hueso (del inglés, *bone morphogenic*

protein); ERK (del inglés, *extracellular signaling-regulated protein kinase*); MARKs (del inglés, *microtubule-affinity-regulating kinases*); RECK (del inglés, *reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*); MMP, metaloproteinasas; PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*); PDCD4 (del inglés, *programmed cell death protein 4*); TIMP3 (del inglés, *tissue inhibitor of metalloproteinases 3*).

Otro mecanismo de regulación de la formación de invadosomas es la dependiente de ligasas de ubiquitina tipo E3. En particular, c-Cbl, una ligasa E3 de ubiquitina, afecta negativamente la migración de varios tipos de células tumorales tal como glioma [100], cáncer de pulmón [101], y cáncer del páncreas [102], entre otros.

A pesar del incremento del uso de SPIONs como plataforma de tratamiento contra el cáncer, incluido la inmunoterapia contra tumores del páncreas [58], se conoce poco de su interacción y efecto sobre la dinámica de los invadosomas, y, por consiguiente, no se ha estudiado a fondo cómo afectan la capacidad de invasión de células tumorales del páncreas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que varios tipos de nanopartículas inorgánicas interactúan con el citoesqueleto, donde impiden la polimerización de la actina filamentosa (F-actina), sugiriendo un efecto mecánico sensible sobre las estructuras celulares basadas en F-actina [103, 104].

1.3.4 Estrés oxidativo y metabolismo del hierro inducido por SPIONs

Las nanopartículas inorgánicas pueden producir especies reactivas del oxígeno (EROs), tales como singletes del oxígeno, radicales hidroxilos o superóxidos, a través de reacciones fotoquímicas o similares a las reacciones de Fenton [105-107]. Estas EROs, a su

vez, inducen estrés oxidativo en sistemas biológicos. *In vivo*, se hipotetiza que la producción de EROs es el principal mecanismo responsable de la nanotoxicidad que afecta a los componentes sanguíneos, al bazo, riñones, sistema respiratorio, hígado, o sistema inmune [108, 109]. El secuestro de nanopartículas por células del SFM hace de órganos como el hígado y bazo dianas de los efectos del estrés oxidativo [110, 111]. Otros órganos, como riñones y pulmones, expuestos a un alto flujo de sangre también están sujetos al estrés oxidativo inducido por nanopartículas [112].

La producción de EROs inducida por SPION puede afectar la fisiología celular a varios niveles. Tal es el caso del efecto de la producción de EROs inducido por nanopartículas de óxido de hierro en células del endotelio vascular. Como consecuencia, la morfología de las células endoteliales cambia notablemente debido a la formación de fibras estresadas de actina [113].

Por otra parte, la producción de EROs puede afectar varias rutas de señalización y procesos biológicos. La señalización mediada por Notch1 está asociada a la producción de EROs [103]. Igualmente, las sirtuínas, particularmente, Sirtuína-1 (SIRT1), son moléculas que vinculan a las EROs con diferentes procesos celulares. De hecho, SIRT1 protege a varios tipos celulares del daño causado por EROs, como las células neuronales y mesangiales [114], [115]. La señalización mediada por Notch1 ha sido igualmente asociada a la producción de EROs [116, 117]. Esto sugiere que las nanopartículas que inducen la producción de EROs, como SPIONs, pueden modular las rutas moleculares reguladas por reacciones redox.

Notablemente, uno de los procesos relacionados con el estrés oxidativo es el metabolismo del hierro [118]. El tráfico de las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro por el compartimento endosomal y lisosomal conlleva a la degradación del núcleo inorgánico con la consecuente liberación de cationes de hierro al citosol.

La entrada de hierro a la células está gobernado por dos mecanismos principales: una dependiente del hierro unido a la transferrina, que interactúa con su receptor en la membrana; y el otro, depende de transportadores de metales divalentes, como DMT-1,

que regulan el transporte en uno y otro sentido del Fe^{2+} [119]. Una vez dentro de la célula, el hierro es reducido por enzimas endosomales especializadas, y transportadas al citosol mediante transportadores de metales divalentes como DMT1 [120]. Esto puede provocar el aumento de la concentración de hierro activando mecanismos regulatorios del metabolismo de este metabolito. Puede formar parte de reservorio de este metal conjugándose con ferritina, y también a otras proteínas con afinidad hacia el catión [119, 121]. Igualmente, es liberado fuera de la células a través de transportadores como la ferroportina-1 [120].

Uno de los primeros factores que responden a los niveles de hierro intracelular es la proteína **IRP-1 y -2**¹⁴. En condiciones de deficiencia de hierro, IRP se unen a los elementos que responden al hierro, IRE (del inglés, *iron responsive element*) presentes en las regiones 5' UTR y 3'UTR de los transcritos de ferritina y del receptor de transferrina, respectivamente. De esta forma, la traducción de ferritina se inhibe, y se estabiliza el transcrito del receptor de transferrina y, por ende, su traducción [122]. Como resultado se activan los mecanismos celulares para la internalización de hierro del medio extracelular. En el caso contrario, es decir, en condiciones de exceso de hierro intracelular, ocurre lo contrario a lo descrito, puesto que IRP une hierro lo que provoca su degradación. Por lo tanto, el aumento de hierro intracelular debido a la degradación de nanopartículas de óxido de hierro pudiera provocar la inestabilidad de IRP, y, por consiguiente, los mecanismo celulares para exportar/almacenar el excedente de hierro.

1.4 Nanomedicinas y su interacción con el sistema inmunológico

1.4.1 Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM)

El sistema fagocítico mononuclear (SFM) -primeramente conocido como el sistema retículo-endotelial (SRE))- es un sistema difuso compuesto por células con alta capacidad fagocítica, excepto granulocitos, e incluye las células derivadas de precursores monocíticos de la médula ósea, monocitos del torrente sanguíneo, y macrófagos residentes o histiocitos de órganos y tejidos, así como también células fibroblástica

¹⁴ **IRP2**: del inglés, *iron-responsive element-binding protein*

reticulares de tejidos hematopoyéticos [123, 124]. Aparte de su capacidad fagocítica, las células del SFM comparten su alta plasticidad en cuanto a la expresión génica [124].

Los macrófagos son una de las primeras células en responder a la infección o daño tisular, y son responsables del inicio de una respuesta inmune correcta [125]. Los macrófagos exploran el tejido en busca de amenazas externas y limpian el tejido del material potencialmente inmunogénico derivados de virus, bacterias, cuerpos apoptóticos y necróticos, entre otros. Receptores especializados permiten el reconocimiento de patrones moleculares extraños, conllevando a eventos moleculares intracelulares que orquestan una respuesta inmune. Estos procesos moleculares incluyen la secreción de moléculas señalizadoras como las citoquinas y quimioquinas que activan, inhiben, o atraen a otros tipos celulares como las células dendríticas (DC, del inglés *Dendritic Cells*) o células T, y, además, la expresión de ligandos co-estimuladores que potencian la activación de células T y B [126, 127].

1.4.2 Polarización de Macrófagos

Asociados a la clásica diferenciación de células colaboradoras T en **Th1** y **Th2**¹⁵, la polarización clásica de los macrófagos se subdivide en M1 y M2. Los macrófagos con fenotipo M1 derivan de la activación por componentes bacterianos, por ejemplo lipopolisacáridos, **LPS**¹⁶, o la citoquina derivada de células Th1, IFN γ . En tanto, el fenotipo M2 deriva de la activación por la citoquina derivada de células Th2, IL-4. Los macrófagos M2 muestran mayor capacidad fagocítica, mayor expresión de receptores de manosa, receptor scavengers, mayor producción de ornitina y poliaminas a través de la ruta de la arginasa, concomitantemente con un bajo perfil de IL-12 y alto de IL-10 y del receptor señuelo (del inglés *decoy*) de IL-1, IL-1RA (*Figura I-5B*). En términos de interacción con células linfoides, los macrófagos M1 expresan quimioquinas atrayentes de células Th1 como CXCL9 y CXCL10 que actúan a través del receptor CXCR3; en tanto, los

¹⁵ **Th1/Th2** (del inglés *T helper 1 o 2*): Células T efectoras con alta secreción de IFN γ (Th1) y su diana son los patógenos intracelulares, o IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Th2), cuyas dianas son parásitos extracelulares.

¹⁶ **LPS**: del inglés *lipopolysaccharide*

macrófagos tipo M2 utilizan quimioquinas como CCL17, CCL22 (ambas interactúan con el receptor CCR4) y CCL24 (interactúa con el receptor CCR3) para atraer células T_H2 (Figura I-5A y 5B).

Sin embargo, en algunos escenarios la polarización de macrófagos conlleva a fenotipos con características compartidos entre los clásicos M1 y M2. De esta forma, la activación con LPS o IL-1 conjuntamente con inmunocomplejos de anticuerpos, TGFb, glucocorticoides o IL-10, deriva en fenotipos similares a M2 que solo comparten algunas características con M2 (activados con IL4 o IL-13) (Figura I-5C y 5D). Incluso en condiciones pato-fisiológicas en las que los macrófagos se enfrentan a señales variables, se han descrito fenotipos intermedios y mixtos entre M1 y M2. Tal es el caso de la infección monocítica por el citomegalovirus humano que induce una polarización atípica M1-M2 con alto componente M1 pero con algunos M2 tal como la expresión de genes como *IL1RA*, *IL10*, *CCL18* y *CCL22* [128].

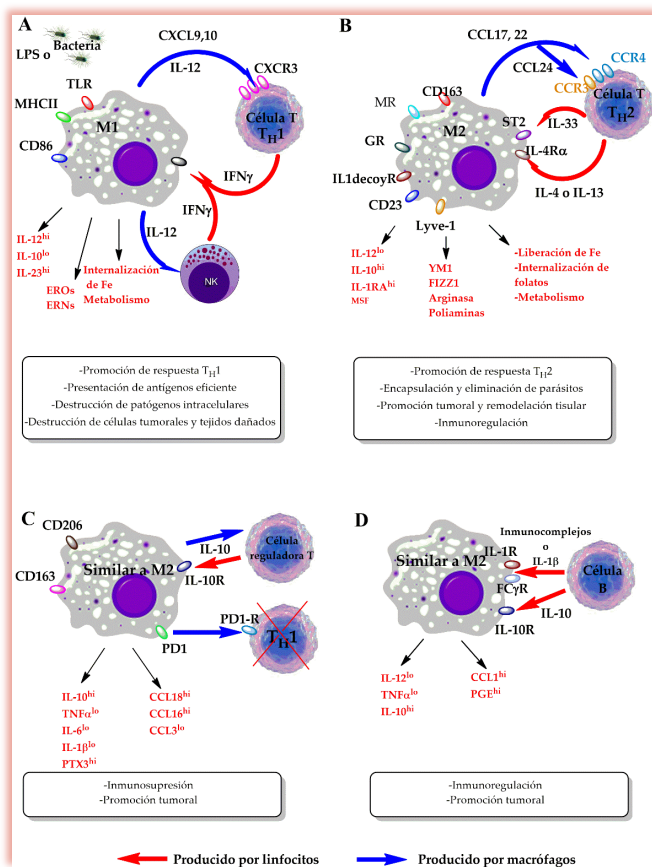


Figura I-5. Activación y polarización de macrófagos y su interrelación con linfocitos. EROs, especies reactivas del oxígeno; ERNs, especies reactivas del nitrógeno.

1.4.3 Señalización por TLR4

La activación de macrófagos y otras células del Sistema inmune innato depende de receptores de reconocimiento de patrones moleculares, como los TLR [129]. Esta familia de receptores consistente de 13 miembros, con dominios extracelulares ricos en leucina y responsable del reconocimiento de patrones moleculares microbianos como LPS [130, 131]. Particularmente, TLR-4 se ha asociado a la activación de macrófagos y DCs inducida por policonaciones [132]. En términos generales, la activación de TLR-4, por parte de LPS y con ayuda de los co-receptores CD14 y MD2, es dependiente de la proteína adaptadora de MyD88, con dominio TIR (del inglés, *Toll/interleukin-1 receptor*) (**Figura I-6**). Ambas proteínas interactúan a través de sus dominios TIR. Esto provoca la translocación de la quinasa tipo 1 de serina/treonina asociada al receptor de IL-1 (IRAK-1, del inglés *Interleukin-1 receptor-associated kinase-1*) en conjunción con la proteína adaptadora Tollip [133-135]. IRAK-1 contiene motivos consensos para la interacción con TRAF6 (del inglés, *TNF receptor associated factor 6*), que es reclutada conjuntamente con la quinasa IRAK-4, relacionada con IRAK-1, formando así el denominado Complejo 1. La autofosforilación de IRAK-4 conlleva a la fosforilación y completa activación de IRAK-1 por IRAK-4 [136]. Como consecuencia, IRAK-1 se desasocia de MyD88 y Tollip, pero no de TRAF6. El complejo IRAK-1/TRAF6 se asocia entonces con el pre-formado complejo proteico TAK1 (del inglés, *Transforming Growth Factor β -activated kinase 1*)-TAB1 (del inglés, *TAK1-binding protein*)-TAB2 (o TAB3), formando el denominado Complejo II [137]. El complejo TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 (o TAB3) migra al citosol, quedando IRAK-1 asociado a la membrana donde es ubiquitinada [138].

Una vez en el citoplasma, TRAF6 se asocia con el complejo enzimático de conjugación de ubiquitina E2, Ubc13/Uev1A, formando el Complejo III [139]. Como resultado, TRAF6 es ubiquitinado con ayuda de su **dominio dedo de zinc RING¹⁷**, proceso necesario para la

¹⁷ **Dominios dedo de zinc RING, del inglés *zinc RING finger***: tipo de dedo de zinc conformado por la secuencia aminoacídica Cys₃HisCys₄ y que es capaz de quelar cationes de zinc. El dominio contiene entre 40 y 60 aminoácidos. RING, acrónimo de *Really Interesting New Gene*.

activación de IKK y la quinasa **JNK**¹⁸ [140]. Como resultado, NF- κ B es activado. Co-existe una ruta independiente de MyD88 que involucra el reclutamiento del adaptador relacionado con TRIF (del inglés, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), y TRAM (del inglés, *TRIF-related adapter molecule*) [141].

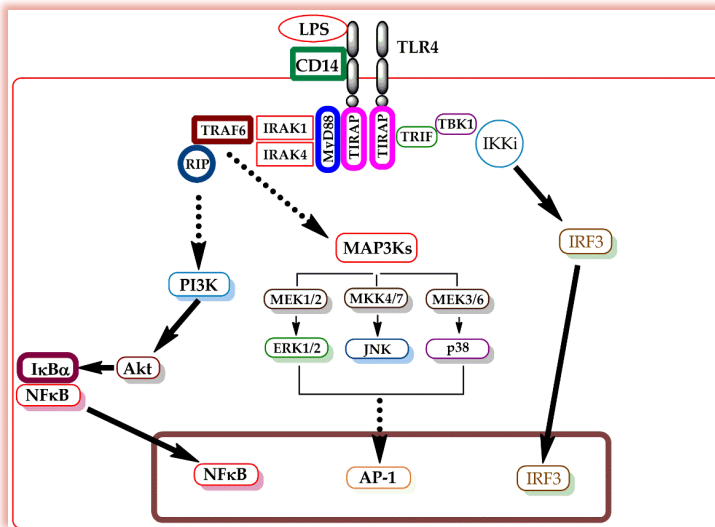


Figura I-6. Activación de macrófagos a través de TLR4 por LPS.

Como consecuencia, varios intermediarios son activados, incluido la familia de las MAPK (p38, p44/p42, y JNK) que conducen a la activación del

factor de transcripción AP-1 [142], Akt que conduce a la activación de NF- κ B [143], y la quinasa IKKi que conduce a la activación de IRF3 [144] (*Figura I-7*)

1.4.4 Migración de macrófagos

Los macrófagos, a diferencia de leucocitos y neutrófilos que migran a velocidades ascendentes a 25-30 μ m/min *in vitro*, viajan a velocidades ascendentes de aproximadamente 1 μ m/min. Sin embargo, ante estímulos pueden alcanzar la velocidad de 10 μ m/min. Los macrófagos muestran los dos tipos de motilidades celulares: el **movimiento mesenquimal**¹⁹ que manifiesta una actividad degradativa, y el **movimiento ameboide**²⁰, necesario para el trasiego intersticial de las células sin remodelación de la matriz extracelular. Especial atención merecen los podosomas, estructuras ricas en actina

¹⁸ **JNK**: del inglés, *c-jun N-terminal kinase*.

¹⁹ **Movimiento mesenquimal** (del inglés, *mesenchymal movement*): modalidad de movimiento celular caracterizado por la polarización celular para formar un frente de migración con protrusiones ricas en actina (como lamelopodias), conllevando a las interacciones adhesivas con el sustrato y actividad proteolítica, seguida de la retracción de la zona trasera contráctil.

²⁰ **Movimiento ameboide** (del inglés, *amoeboid movement*): modalidad de movimiento celular similar a reptar que implica la formación de proyecciones citoplasmáticas temporales (pseudopodias) y que no manifiestan actividad degradativa.

filamentosa asociados con células mielomonocíticas. Se componen de un núcleo de actina rodeado por moléculas de adhesión y estructurales. Entre estas, destacan las integrinas, nucleadores de actina, activadores de la polimerización de actina, proteínas de unión y entrecruzamiento de actina, así como quinasas, GTPasas pequeñas; todas ellas regulan la maquinaria de la dinámica de formación de los podosomas. Estructuralmente hablando, muestran aproximadamente 1 μm de diámetro y 0.4 μm de profundidad que se extienden en el espacio intracelular. La dinámica de formación suele durar de 2 a 10 minutos, en contraste con la de las invadopodias (ver más adelante), que dura entre 1 y 3 horas [145]. Aunque inicialmente se consideraron estructuras vinculadas a la migración dado la elevada dinámica de formación, recientes estudios los vinculan a la actividad degradativa de células como los macrófagos. Esta actividad la aportan las enzimas presentes en la compleja estructura de los podosomas, como las metaloproteinasas, seprinas, y catepsinas. Entre las metaloproteinasas, la MT1-MMP juega un papel importante al ser la responsable de la activación de otras metaloproteinasas como MMP2 y su función intrínseca de collagenasa/gelatinasa [146].

1.4.5 *Inmunogenicidad/Propiedades adyuvantes de nanomateriales*

En el desarrollo de nanosistemas terapéuticos, el estudio de la inmunogenicidad es de vital importancia y determina la factibilidad de su uso en tratamientos clínicos [109]. La inmunoreactividad de las nanopartículas depende de las capas de recubrimiento así como de las propiedades químico-físicas como el tamaño, la carga superficial y la forma [147-149]. Todas estas variables influyen en la interacción de las nanopartículas con los componentes del SFM en su paso por el torrente sanguíneo y linfático y su paso a los tejidos adyacentes [150]. Igualmente, a la largo del tránsito de los nanomateriales a través de los fluidos del organismo, interactúan y son **opsonizados**²¹ por proteínas solubles, y a su vez interactúan con las células sanguíneas, y/o células residentes tisulares con posibles efectos biológicos en las mismas.

²¹ **Opsonización:** conjugación de opsoninas a la superficie de microbios y macrocomplejos que median el reconocimiento por células fagocíticas y su fagocitosis.

El papel de la nanomateriales en sistemas vacunales se puede diferenciar desde el punto de vista de la acción del propio material respecto al antígeno: (1) nanomateriales como meros transportadores del antígeno; (2) nanomaterial como inmunopotenciador. Estos últimos basan sus propiedades inmunopotenciadoras en la interacción con el sistema fagocítico mononuclear y células presentadoras de antígenos (CPAs). Variables como la ruta de internalización, las señales de maduración, y las promotoras de presentación antigénica cruzada son vitales en el entendimiento de los nanomateriales como plataformas adyuvantes.

Generalmente, las partículas con tamaños comparables a patógenos pueden fácilmente ser reconocidos e internalizados por CPAs e inducir una respuesta inmune competente [151-153]. Las DCs internalizan preferencialmente partículas en el rango de 20-200 nm, en tanto, los macrófagos internalizan partículas en el rango de 0.5-5 μm [151]. Al igual que el tamaño, la carga superficial influye en la internalización del nanomaterial. De hecho, los nanomateriales catiónicos (alta carga positiva superficial) inducen mayor internalización por parte de CPAs por su interacción electrostática con los dominios cargados negativamente en sus membranas [154]. Por ejemplo, la carga positiva superficial de partículas de poliestireno de 1 μm , aumenta la internalización de las mismas por DCs y macrófagos [155, 156]. Otro factor que puede influir en el modo en que los nanomateriales interactúan con CPAs es su hidrofobicidad/hidrofilia, con algunos estudios demostrando que las partículas hidrofóbicas muestran una mayor inmunogenicidad que las hidrofílicas [157].

1.4.6 *Polímeros catiónicos como adyuvantes*

Los polímeros catiónicos inducen una respuesta inmune, principalmente por la activación de macrófagos, células dendríticas y otros tipos celulares relacionados [158, 159]. No solo inducen una respuesta innata, sino también, potencian la inmunidad adaptativa, reforzando su potencial como adyuvantes [160, 161].

De los polímeros catiónicos, la polietilenimina (PEI) es capaz de inducir la diferenciación de macrófagos a perfiles M1 mediante la activación de la señalización por TLR-4 [132]. De

esta forma, cuando es inyectado intratumoralmente, la PEI conlleva a un cambio en el perfil de activación de macrófagos en el microambiente tumoral, con un aumento de la secreción de IL-12 y una disminución de la IL-10 [162].

1.4.7 *Inmunogenicidad de nanomateriales inorgánicos*

En cuanto a la inmunogenicidad de los nanosistemas sólidos, basados en núcleos inorgánicos, generalmente óxidos de metales y/o metales, los indicios son más controvertidos. Las nanopartículas de óxido de hierro (SPION) modulan negativamente la respuesta inmune T_H2 contra la ovoalbúmina (OVA), al inhibir la respuesta tardía de hipersensibilidad inducida por este antígeno en ratones [163] o la secreción inducida por OVA de IFN- γ [164], esta última, asociada a la reducción del glutatión. Sin embargo, variando las concentraciones de SPIONs se obtienen resultados distintos de acuerdo a los diferentes perfiles *T helper* (T_H) en modelo murino de alergia contra OVA [165]. Otros datos asocian a las nanopartículas de óxido de hierro con un aumento de la respuesta T_H1 a través de la activación de DCs mediado por exosomas liberados por células alveolares tras el tratamiento con nanopartículas [166]. La propia degradación de las nanopartículas puede llevar a un aumento de la catepsina L así como también de la secreción de ferritina, ambos eventos relacionados con el aumento de la secreción de TNF- α e IL-10 por los macrófagos [167].

Hipótesis y Objetivos de trabajo

Hipótesis: Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con poli-etilénimina podrían interactuar con las células tumorales, endoteliales, fibroblastos o macrófagos induciendo efectos biológicos independientemente de su función como agentes de transfección.

1.1 Objetivos de trabajo

- 1.1.1 Síntesis química de nanopartículas magnéticas recubiertas con poli-etilénimina
- 1.1.2 Estudiar la capacidad transfectante de nanopartículas magnética recubiertas con poli-etilénimina
- 1.1.3 Estudiar la interacción de las nanopartículas magnéticas recubiertas con poli-etilénimina con células de adenocarcinoma pancreático murino (Pan02)
- 1.1.4 Estudiar la interacción de las nanopartículas magnéticas recubiertas con poli-etilénimina con células endoteliales (SVEC4-10) y fibroblastos murinos (NIH 3T3)
- 1.1.5 Estudiar la interacción de las nanopartículas magnéticas recubiertas con poli-etilénimina con células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos) murino (RAW264.7)

2. Materiales y Métodos

2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas con PEI

Las nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenimina (PMag) se sintetizaron de acuerdo a un protocolo previamente publicado [168]. A una mezcla de cloruros de Fe^{2+} y Fe^{3+} se le adicionó una solución de polietilenimina (PEI) de 25 y 750 kDa, surfactante (Zonyl FSA o Plurónico F-127) y NH_4OH . Ambas soluciones estaban a 4°C y en atmósfera libre de oxígeno. Inmediatamente, el producto formado (de color marrón-oscuro) se homogenizó a temperatura ambiente o con calentamiento a 90°C , durante 2 h. Posteriormente, se dializó contra agua destilada y esterilizada por >72 h (*Figura M-1*).

Para la caracterización físico-química de las PMags se analizaron diferentes parámetros. Se tomaron imágenes de electrón-transmisión (TEM, del inglés *Transmission Electron Microscopy*) usando el microscopio 200-KeV JEOL-2000 FXII para analizar el tamaño. Para determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta (carga), las nanopartículas se diluyeron en agua destilada hasta $\sim 50 \mu\text{g/ml}$, y se analizaron por dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*) (Malvern NanoZS). La difracción de rayos X se midió en un difractómetro para polvo Bruker D8 Advance, usando radiación de $\text{Cu K}\alpha$ con un detector de energía discriminador (Sol-X). Las muestras se secaron en congelación y los patrones se registraron entre 10 y 80 en 2θ a 0.01 grados/segundo.

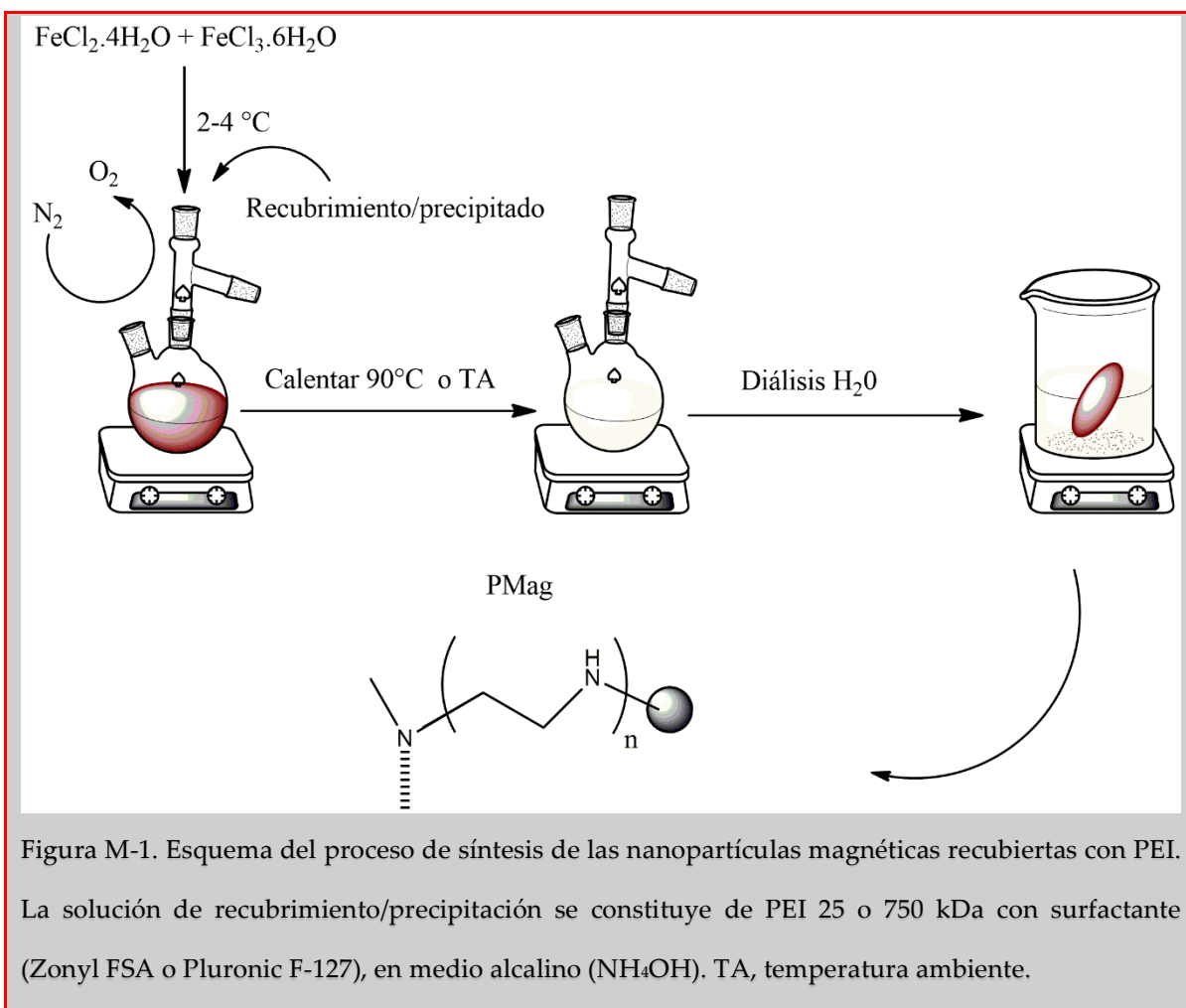


Figura M-1. Esquema del proceso de síntesis de las nanopartículas magnéticas recubiertas con PEI. La solución de recubrimiento/precipitación se constituye de PEI 25 o 750 kDa con surfactante (Zonyl FSA o Pluronic F-127), en medio alcalino (NH_4OH). TA, temperatura ambiente.

2.2 Reactivos y anticuerpos

Las polietilenoimina de 25 y 750 kDa, Plurónico F-127, Zonyl FSA, hidrocloreuro de Cloropromazina (C8138), Filipina III (F4767), metil- β -ciclodextrina (C4555), hidrocloreuro de amilorida (A0370000), Citocalasina D1 (C8273), hidroanísolo butilado (B1253), y yoduro de definileno (DPI: D2926), faloidina-TRITC (P1951) y faloidina-Alexa Fluor 488 (P5282) se adquirieron de Sigma-Aldrich. DAPI (T3605) de Invitrogen. YOYO1 (Y3601) de Molecular Probes (Life Technologies).

Los anticuerpos primarios anti-SIRT1 (#9475), -Jagged1 (#2620), -ciclina D1 (#2922), -fosfo-p38 (#9211), -fosfo-p44/p42 MAPK (#9106), -fosfo-JNK (#9251), -p38 (#9212), -JNK (#9252), -p44/p42 MAPK (#9475), se adquirieron de Cell Signaling. Los anticuerpos primarios anti-

RelB (sc-226), -ciclina A1 (sc-596), -sprouty1 (sc-30048), -MMP2 (sc-10736), y -IRP2 (sc-14221), fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology), anti-Notch1 (ab52627) y - Colágeno IV (ab19808) de Abcam, y anti-vinculina (V9131) de Sigma-Aldrich.

2.3 *Cultivo celulares*

Las líneas celulares utilizadas fueron: HEK293 (ATCC, CRL-1573), HeLa (ATCC, CCL-2), NIH 3T3 (ATCC, CRL-1658), Pan02 (cortesía del Dr. S. Mañes, CNB/CSIC), SVEC4-10 (ATCC, CRL-2181), B16F10 (ATCC, CRL-6475), RAW264.7 (ATCC, TIB-71) se cultivaron en medio DMEM con los aditivos suero fetal bovino (SFB) (10 %), penicilina/estreptomicina, L-glutamina (2 mM), y piruvato de sodio. La línea celular pro-monocítica humana THP1 (ATCC, TIB-202) se cultivó en medio RPMI, suero fetal bovino (10 %), L-glutamina (2 mM), y penicilina/estreptomicina.

2.4 *Aislamiento de macrófagos peritoneales y esplenocitos de ratón*

Los ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories) se mantuvieron en ambiente libre de patógenos en el Animalario del Centro de Nacional de Biotecnología (CNB). Los estudios con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales del CNB (Ref. 11022). Ratones hembras C57BL/6J (8 semanas de edad) fueron sacrificadas, y 10 ml de PBS 1X frío se inyectaron en el peritoneo. Tras un lavado leve de la cavidad peritoneal, se recuperó el PBS 1X, y centrifugó para la recuperación de macrófagos peritoneales. Las células se lavaron con PBS 1X frío y resuspendidas en medio DMEM completo fresco. Se cuantificaron los macrófagos y plaquearon para los ensayos de activación.

2.5 *Ensayos de citotoxicidad*

Las células (2×10^4) fueron cultivadas con PMags a diferentes concentraciones en medio completo DMEM, por 24 h en placas de cultivo de 96 pocillos. Durante las últimas 4 h, se adicionó el reactivo PrestoBlue (Invitrogen, # A13261) a una dilución final de 1:10. Se

midio la fluorescencia con un filtro de excitación de 535 nm y de emisión de 615 nm. Como control, se tomaron las medidas de fluorescencia del medio completo solo. La viabilidad celular se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{fluorescencia célula tratada} - \text{fluorescencia medio}}{\text{untreated cell fluorescence} - \text{medium fluorescence}} * 100$$

2.6 Conjugación con ADN y ensayos de transfección con pEGFP-N3

El plásmido pEGFP-N3 (30 µg/ml) se incubó con concentraciones crecientes de PMags a temperatura ambiente y durante 30 minutos. Los conjugados se resolvieron en gel de agarosa al 1 % y las bandas de ADN visualizadas por luminiscencia en UV. El plásmido solo se tomó como control.

Para los ensayos de transfección, las células HEK293 se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos en medio completo DMEM hasta ~80 % de confluencia. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X frío, y se incubaron con conjugados PMag/pEGFP-N3 en medio completo DMEM (cantidad total por pocillo 1000 ng de plásmido). Después de 48 h de cultivo, las células se lavaron, fijaron con PBS 1X/ paraformaldehído (PFA) 4 % durante 20 minutos, y los núcleos fueron teñidos con DAPI. La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) se analizó por microscopía de fluorescencia.

2.7 Conjugación con ARN interferentes y ensayos de silenciamiento de Bcl-2

ARN interferentes específicos de Bcl-2 (30 µg/ml) se incubaron con concentraciones crecientes de PMags a temperatura ambiente y durante 30 minutos. Los conjugados se resolvieron en gel de agarosa al 2 % y las bandas de ARN se visualizaron por luminiscencia en UV. ARNi sin conjugación se tomaron como control. Los ARN interferentes utilizados son:

Tabla M-1. Secuencias de ARN interferentes utilizados.

ARNi	Secuencia
ARNi (a)	Pasajero: 5'-GCUGCACCUGACGCCCUUCdTdT-3' Guía: 5'-GAAGGGCGUCAGGUGCAGCdT-Metil-3'
ARNi (b)	Pasajero: 5'-GCUGCACCUGACGCCCUUCdTdT-3' Guía: 5'-GAAGGGCGUCAGGUGCAGCdT-3'
ARNi (c)	Pasajero: 5'-GFGA ^{F22} GAAGUACAFCCAUFdTdT-3' Guía: 5'-AAUGGAUGUACUUCAUCACdT-Metil-3'

Para los ensayos de transfección, las células HEK293 se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos en medio completo DMEM hasta ~80 % de confluencia. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X frío, y se incubaron con conjugados PMag/ARNi en medio completo DMEM (cantidad total por pocillo 80 pmol de ARNi). Después de 48 h de cultivo, las células se lavaron, y lisaron para la obtención de lisado de proteínas. Como control positivo, se utilizó el reactivo X-tremeGene (04476093001, Roche), siguiendo los pasos de acuerdo al protocolo de la compañía.

2.8 Estudio de las rutas de endocitosis

Para el estudio de las rutas de endocitosis involucradas en la internalización de PMags, las células fueron pre-tratadas con inhibidores específicos para cada ruta de endocitosis, en medio completo DMEM. Los inhibidores utilizados fueron: Clorpromazina (10 µg/ml, inhibidor de la ruta dependiente de clatrina); Filipina III y metil-β-ciclodextrina (5 µg/ml y 5 mM, respectivamente, ambos inhibidores de la ruta dependiente de caveolina); amilorida (0.625 mM, inhibidor de la macropinocitosis); y, Citocalasina D (10 µM, desestabilizador de filamentos de actina). Tras el pre-tratamiento con los inhibidores se adicionaron los conjugados PMag/pEGFP-N3 (1000 ng de plásmido por pocillo), y se incubaron las células por 48 h. Se analizó la expresión de GFP por microscopía de

²² F: Modificación química por la adición de grupos flúor a Uracilos

fluorescencia. Se procedió de igual manera para el ensayo de internalización/asociación del conjugado pGLuc-YOYO1/PMag. En este último caso, se incubaron por 4 horas.

2.9 *Activación de macrófagos y esplenocitos*

Células RAW264.7 y THP1 diferenciadas durante >72 h con PMA fueron cultivadas en medio completo en placas de cultivo de 12 o 6 pocillos. Cuando fue necesario, se pre-trataron por 2 h con BHA a 150 μ M, CLI-095 a 1 μ g/ml, o DPI a 60 μ M. Después, fueron tratadas con PMags a 6.25 μ g/ml durante, 0, 30, 60 y 120 minutos (para ensayo de activación de cascada de fosforilación), o 6 h (para ensayo de secreción de citoquinas, marcadores de activación, y análisis semi-cuantitativo RT-PCR). Las monocapas celulares se lavaron y despegaron para su posterior lisis. El sobrenadante de los cultivos se conservó a -80°C hasta la cuantificación de citoquinas.

2.10 *Tratamiento de la línea murina de carcinoma pancreático, Pan02*

Las células se cultivaron en placas de cultivo de 6 pocillos. Cuando fue necesario, se trataron con BHA a 150 μ M 2 h antes del tratamiento con PMags (6.25 μ g/ml). Se cultivaron a 37°C , 5 % CO_2 durante 2, 6 y 24 h. Tras el periodo de cultivo se lavaron con PBS 1X frío y se cosecharon para su lisis posterior.

2.11 *Determinación de especies reactivas del oxígeno (EROs)*

Las células se cultivaron con o sin estímulos, y se añadió por los últimos 15 minutos el reactivo $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (5 μ M) a 37°C y 5 % CO_2 , para permitir la reacción de las esterasas intracelulares que oxidan el compuesto a su forma fluorescente en presencia de EROs. Inmediatamente después se determinó la fluorescencia por citometría de flujo.

2.12 *Western-blot*

Tras estimulación, las células se lavaron con PBS 1X frío, rascadas, y fueron lisadas con solución de Tritón X100 al 1 % con inhibidores de proteasas (leupeptina, 1 μ g/ml; NaF,

5nM; ortovanadato de sodio, 1mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMSF, del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1 mM; EDTA, 1 mM; aprotinina, 1 µg/ml; y, ácido ocláico, 2 nM. Iguales cantidades de lisado proteico (40 µg/pocillo) se dispensaron y se resolvieron en gel SDS-PAGE, al 12 %. Las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosas PVDF de 0.2 µm, que luego fueron bloqueadas con solución salina de Tris-base (TBS, del inglés *Tris-base saline*) 1X/ Tween-20, 0.05 %/albúmina de suero bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*), 5 % (temperatura ambiente, 30 minutos). Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en TBS 1X/Tween-20, 0.05 %/BSA, 1 %, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron con la misma solución de dilución tres veces, e incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP (del inglés, *horseradish peroxidase*) a una dilución 1:1000 en TBS 1X/Tween-20, 0.05 %/BSA, 1 %, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavados exhaustivos, las bandas de proteínas se visualizaron después de la incubación con el reactivo de detección para Western Blotting, ECL (Amersham, RPN2106). Se usó el programa ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, NIH, del inglés *National Institute of Health*, EUA) para cuantificar la intensidad de las bandas correspondientes. En todos los casos, se referenciaron los valores contra la intensidad de expresión de β-actina.

2.13 ELISAs

Se utilizaron kits para detectar citoquinas por ELISA. Las citoquinas determinadas fueron IL-12 p70 murina (ELISA Set, 555256, BD Biosciences); IL-12 p70 humana (ELISA Set, 555183, BD Biosciences), IL-10 humana (Quantikine ELISA kit, D1000B, R&D), e IFN-γ murino (ELISA Set, 55138, BD Biosciences). Brevemente, se recubrieron e incubaron, a 4 °C durante toda la noche, placas High binding MaxiSorp (NUNC) con el correspondiente anticuerpo de captura a la concentración sugerida en solución tampón de recubrimiento (carbonato sódico, 0.1 M; pH 9.5). Tras lavados con PBS 1X/Tween-20, 0.05 %, se bloquearon con ≥200 µl solución diluyente (PBS 1X/ SFB, 10 %) durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Tras lavados, se aplicaron las muestras y los estándares respectivos. Se

incubaron a TA durante 2 h. Se lavaron e incubaron con el anticuerpo de detección correspondiente durante 1 h a TA. Tras lavados exhaustivos, se incubaron con 100 µl de solución de sustrato a TA por 30 minutos. La reacción se paró adicionando 50 µl de H₂SO₄. Se determinó la absorbancia a 450 nm con sustracción a 590 nm.

2.14 PCR semi-cuantitativa

Los ARNs fueron extraídos de células mediante PureLink RNA Mini Kit (Applied Biosystems; #12183018A). Aproximadamente 30 ng de ARN se usó por muestra para producir ADN complementario mediante una retro-transcripción basada en la enzima MultiScribe (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, # 4374966). Un programa de dos pasos para la reacción de retro-transcripción (RT-PCR, del inglés *reverse transcription PCR*) (95 °C durante 15 segundos, 60 °C por 60 segundos, 40 ciclos) fue utilizado para la amplificación con oligos específicos (*Tabla M-2*). La expresión de genes se analizó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y referenciados contra la expresión del transcrito de la β -actina. Para el análisis global, se transformaron los valores de expresión relativa de transcritos a log₂ y se representaron como mapas de color (*Heat Maps*) mediante el programa MeV (The Institute for Genomic Research).

Tabla M-2. Ontología y función de genes, y oligos específico para la amplificación de transcritos (Sigma-Aldrich)

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
<i>Cat</i>	Cromosoma: 2; NC_000068.7 (103453904..103485640, complement)	Catalase	F ²⁴ : CTCCATCAGGTTTCTTTCTTG
			R: ²⁵ CAACAGGCAAGTTTTTGATG

²³ Datos procedentes de *NCBI Gene Database*

²⁴ F: del inglés, Forward

²⁵ R: del inglés, Reverse

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
<i>Duox1</i>	Cromosoma 2, NC_000068.7 (122313811..122349226)	Oxidasa dual 1	F: CTCTACATTCTGCTCATCATAC R: TCCCCCACATAAATAATTGC
<i>Duox2</i>	Cromosoma 2, NC_000068.7 (122279253..122298743, complement)	Oxidasa dual 2	F: ATCTACATTACTCAGCTGGC R: ATCTTACGTACCTGTGGATG
<i>Txrnd2</i>		Reductasa de tioredoxina 2	F: GAATCACAAGTGACGACATC R: AAAGATGACATTTGCTGGTC
<i>Txndc2</i>	Cromosoma 17, NC_000083.6 (65637505..65642204, complement)	Del inglés, Thioredoxin domain containing 2	F: CAGCAACGAAAATCCATTAC R: CTTCTGTGGACATATGAAGTG
<i>Sod1</i>	Cromosoma 16, NC_000082.6 (90220742..90226324)	Dismutasa de superóxido	F: CACTCTAAGAAACATGGTGG R: GATCACACGATCTTCAATGG
<i>Sod2</i>	Cromosoma 17, NC_000083.6 (13007839..13018119)	Dismutasa de superóxido	F: CCATTTTCTGGACAAACCTG R: GACCTTGCTCCTTATTGAAG
<i>Sod3</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (52363804..52369738)	Dismutasa de superóxido	F: AGAGAGAGTATTTGGGAACC R: AAACTAAGCTGCAAAGTCTC

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
<i>Tfrc</i>	Cromosoma 16, NC_000082.6 (32608896..32632794)	Receptor de transferrina	F: CAGAAGTTTCTGGTAAACTGG R: TCTGCAAAAGTAATTTCCCC
<i>Slc11a2</i>	Cromosoma 15, NC_000081.6 (100387898..100424209, complement)	Transportador de metales divalentes-1	F: GAGTACATTACAGTGAAGCC R: TGTCTAGACTTGACTAAGGC
<i>Slc40a1</i>	Cromosoma 1, NC_000067.6 (45908070..45926535, complement)	Del inglésm, Iron- regulated transporter-1 (Ferroportina)	F: TCACCTAAAGATACTGAGCC R: CTGGTTATAGTAGGAGACCC
<i>Slc48a1</i>	Cromosoma 15, NC_000081.6 (97784365..97792692)	Transportador de grupos hemo	F: GCAGGATTACTGGAGGAC R: GTCTTTGAGACTCTGATGC
<i>Lcn2</i>	Cromosoma 2, NC_000068.7 (32384637..32387739, complement)	Lipocalina-2	F: ATATGCACAGGTATCCTCAG R: GAAACGTTTCCTTCAGTTCAG
<i>Sprouty1</i>	Cromosoma 3, NC_000069.6 (37639800..37644599)	Sprouty homólogo 1, antagonista señal FGF	F: GAGGATTTTCAGATGCATGG R: TTTGATCTGGTCTAGGGAC
<i>Pdcd4</i>	Cromosoma 19, NC_000085.6	Programmed cell death 4 (inhibidor	F: AAGTACCTCATTTTCACCAC

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
	(53892231..53929861)	de transformación oncogénica)	R: TAGCCTCTTTTCATTTGGTC
<i>Pten</i>	Cromosoma 19, NC_000085.6 (32757577..32826160)	Fosfatasa y homólogo de tensina	F: AACTTGCAATCCTCAGTTTG R: CTACTTTGATATCACCACACAC
<i>Mmu- microRNA- 21</i>	Cromosoma 11, NC_000077.6 (86584067..86584158, complement)		No Disponible
<i>Ccl4</i>	Cromosoma 11, NC_000077.6 (83662584..83664683)	Quimioquina (Motivo C-C) ligando 4	F: GGTATTCCTGACCAAAGAG R: TCCAAGTCACTCATGTACTC
<i>Ccl5</i>	Cromosoma 11, NC_000077.6 (83525778..83530518, complement)	Quimioquina (Motivo C-C) ligando 5	F: AGGAGTATTTCTACACCAGC R: CAGGGTCAGAATCAAGAAAC
<i>Cxcl1</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (90891245..90893121)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 1	F: AAAGATGCTAAAAGGTGTCC R: GTATAGTGTTGTCAGAAGCC
<i>Cxcl2</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (90903899..90905938)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 2	F: GGGTTGACTTCAAGAACATC R: CCTTGCCTTTGTTTCAGTATC

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
<i>Cxcl3</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (90786101..90788093)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 3	F: AAGTCATAGCCACTCTCAAG
			R: GGATCGCTTTTCTCTGATTAG
<i>Cxcl5</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (90759298..90761625)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 5	F: TGTTTGCTTAACCGTAACTC
			R: CAGTTTAGCTATGACTTCCAC
<i>Cxcl7</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (90768518..90770060)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 7	F: GAGGAACCCTAGTGATAAGG
			R: GTTTGATCTCCGTTCTTCAG
<i>Cxcl10</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (92346638..92348889, complement)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 10	F: AAAAAGGTCTAAAAGGGCTC
			R: AATTAGGACTAGCCATCCAC
<i>Cxcl11</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (92359544..92363296, complement)	Quimioquina (Motivo C-X-C) ligando 11	F: CGACAAAGTTGAAGTGATTG
			R: GCACAGAGTTCTTATTGGAG
<i>Vegfa</i>	Cromosoma 17, NC_000083.6 (46016993..46032377, complement)	Factor de crecimiento del endotelio vascular A	F: TAGAGTACATCTTCAAGCCG
			R: TCTTTCTTTGGTCTGCATTC

Gen	Localización ²³	Función	Oligonucleótidos
<i>Tgfb1</i>	Cromosoma 7, NC_000073.6 (25687002..25704996)	Factor de crecimiento tumoral beta-1	F: GGATACCAACTATTGCTTCAG
			R: TGTCCAGGCTCCAAATATAG
<i>Mmp9</i>	Cromosoma 2, NC_000068.7 (164940750..164955850)	Metaloproteinasa- 9	F: CTTCCAGTACCAAGACAAAG
			R: ACCTTGTTACCTCATTG
<i>SerpinE1</i>	Cromosoma 5, NC_000071.6 (137061504..137072272, complement)	Inhibidor de peptidasa Serpina, clade E (nexina, Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1), miembro 1	F: AGCAACAAGTTCAACTACAC
			R: CTTCATTGTCTGATGAGTTC

2.15 Estudio de IRP2 (del inglés, iron responsive element-binding protein)

Células RAW264.7 se cultivaron con medio completo DMEM sobre cubreobjetos tratados con 0.01 % poli-L-lisina (Sigma) y nanopartículas a una concentración final de 6.25 µg/ml. Se incubaron por 6 h a 37 °C y 5 % de CO₂, se fijaron con PBS 1X /PFA, 4 %, y se permeabilizaron con PBS 1X/Tritón X100, 0.5 %, fueron incubadas con anticuerpo de cabra anti-IRP2 (1:200) toda la noche. Subsecuentemente, se incubaron con Alexa488-anti-IgG de cabra (≥45 minutos, a TA), y se montaron con Fluoromount G (SouthernBiotech) sobre portaobjetos. Se usó un microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de inmersión en aceite 63x/1.4 NA para adquirir imágenes, y la fluorescencia total por célula

(FTC) se calculó en imágenes adquiridas en campos aleatorios usando el programa ImageJ (NIH, USA) .

2.16 Estudio de marcadores de activación por citometría

Las células RAW264.7 fueron tratadas con PMags, LPS y PEI por 6 h y marcadas con anticuerpos primarios: FITC-anti- I-A/I-E (553623, Pharmingen), PE-anti-CD40 (553790, Pharmingen), PE-anti-CD80 (553769, Pharmingen) y PE-anti-CD86 (B7-2, 105008, BioLegend). Se analizaron las células en citómetro BD FACScalibur. El programa FlowJo (TreeStar Inc.) se utilizó para el análisis de estos datos.

2.17 Estudio de podosomas e invadosomas

Células RAW264.7 fueron tratadas con PMags (6.25 $\mu\text{g/ml}$) durante 6 h, fijadas con PBS 1X/ PFA 4 %, permeabilizadas con PBS 1X/Tritón X100 0.5 %, y marcadas con anti-vinculina y faloidina-TRITC (marca F-actina). Los núcleos se contrastaron con DAPI. Las imágenes se tomaron con ayuda de un microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de inmersión en aceite 63x/1.4 NA, y grabadas con detector PMT. La adquisición en campo oscuro se realizó usando luz láser de 488 nm. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ. El conteo de podosomas e invadosomas se realizó usando el canal de F-actina de imágenes adquiridas de la zona ventral de las células, y basados en un análisis de imagen en ImageJ descrito por Cervero et al. [169](Figura M-2).

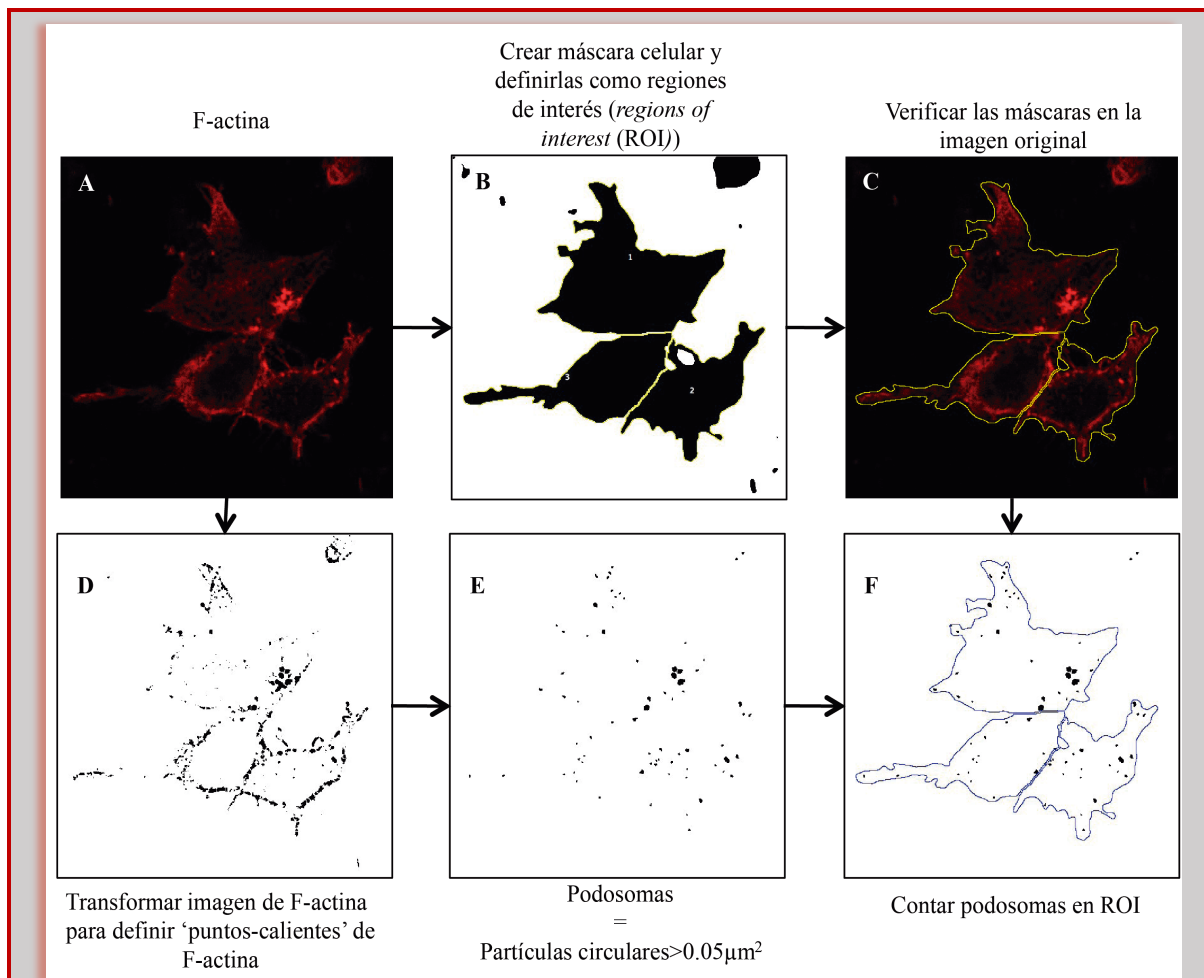


Figura M-2. Las imágenes se procesaron siguiendo un procedimiento similar al descrito [169]. (A) La imagen de F-actina se convirtió a 8-bit para definir tanto las máscaras celulares como los podosomas. (B) La imagen se suavizó (Process>Smooth), el ruido de fondo reducido (Gamma (Process>Math>Gamma (aquí 1.00)), seguido por Median (Process>Filters>Median), y desenfoque gaussiano (Process>Filters>Gaussian Blur); entonces, se ajustó el umbral (Image>Adjust>Threshold (5 to 255)). La imagen se convirtió a formato binario (Process>Binary>Make Binary). Las células individuales se separaron manualmente, y se definieron como regiones de interés (ROI, del inglés *region of interest*) usando la herramienta de análisis de partículas (Analyze>Analyze Particles (tamaño: 150-infinity μm^2 and Circularidad: 0-1)). (C) Las ROI se chequearon contra la imagen original. (D) Se definieron los 'puntos-calientes' de F-actina: suavizando (Process>Smooth), sustrayendo fondo (Process>Subtract Background (6)), y el contraste se subió con ayuda de la corrección gamma (Process>Gamma (1.00)) seguido del filtro tipo convolve (Process>Filters>Convolve (de matriz 5x5 con todos los elementos a -1, excepto el valor central a 30)). La imagen se convirtió a formato binario (Process>Binary>Make Binary) y los objetos adyacentes separados con la función Watershed (Process>Binary>Watershed). (E) Luego se identificaron a los podosomas se cuantificaron según el procedimiento: (Analyze>Analyze

Particles (tamaño: $0.05\text{-}5\text{ }\mu\text{m}^2$ and Circularidad: $0.8\text{-}1.0$)). (F) Finalmente, usando el controlador de ROIs (Analyze>Tools>ROI Manager), los podosomas se cuantificaron por ROI usando la herramienta Find Maxima (Process>Find Maxima, con “Noise Tolerance” a 0). (Modificado de [170])

2.18 Ensayos de degradación de gelatinas

La gelatina de tipo de piel porcina (2 mg/ml, Sigma-Aldrich) se diluyó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ a 50 mM y NaCl a 61 mM a pH 9.3; luego, se tiñó con solución de isotiocianato de rodamina B (Sigma-Aldrich; $36\text{ }\mu\text{g/ml}$, 2 h, en oscuridad). Después de 3 días de diálisis en PBS 1X con cambio de tampón 2-3 veces al día, se usó $80\text{ }\mu\text{l}$ de gelatina fluorescente para cubrir los cubre-objetos; se favoreció el entrecruzamiento químico con ayuda de solución de glutaraldehído al 0.5 % en PBS 1X. Tras el tratamiento con solución de borihidrato de sodio a 5 mg/ml (3 min), los cubre-objetos se esterelizaron con etanol al 70 % e incubaron con medio de cultivo libre de suero antes de su uso. Las células (2×10^4) se cultivaron solas o con PMags ($6.25\text{ }\mu\text{g/ml}$) o LPS ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) sobre los cubre-objetos cubiertos con gelatina marcada fluorescentemente durante 24 h, se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia. Las zonas no fluorescentes de la gelatina (oscuras, gelatina degradada) fueron contadas examinando >10 campos visuales aleatorios con un objetivo 20x en tres ensayos independientes.

2.19 Ensayos de cierre de herida

Se cultivaron células Pan02 o SVEC4-10 en placas de 12 pocillos con molde de silicona (Ibidi culture-inserts, Ibidi) adherido al fondo para dejar espacio libre de células (herida). Al llegar a 100 % de confluencia se retiraron los moldes y se trataron las células con los diferentes estímulos, y se monitorearon entre 18y 20 h tres campos correspondientes a la abertura en la capa celular, con una amplificación de 10x. Se tomaron fotos cada 1 h de cultivo de los campos. Las imágenes se adquirieron con el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI6000B con lente Leica HC PL 10x0.3 NA. Para cuantificar el porcentaje de cierre de la abertura en la capa celular se utilizó el programa ImageJ con el cual se calculó el por ciento de área invadida respecto al área de la abertura a tiempo 0.

Para el análisis de los datos primarios obtenidos (curvas de porcentaje de invasión contra tiempo en h), analizamos la zona de la curva en la que se detecta linealidad. Determinamos en esta zona la pendiente de la recta (% / h). A continuación calculamos la velocidad del frente celular según la fórmula:

$$VFC = (pendiente * A_{total}) / D_{herida}$$

donde, *VFC*: velocidad del frente celular ($\mu\text{m/h}$); *pendiente*: pendiente de la zona lineal de la curva; *A_{total}*: área total en μm^2 de la figura; *D_{herida}*: distancia de la herida a abertura a tiempo 0 h.

Para el análisis de recorrido individual, se siguió una misma célula a la largo de todas la fotos tomadas, se calculó la distancia recorrida desde el borde de la herida en el eje de las y y las x. El índice de direccionalidad se calculó según la fórmula:

$$IDM = D_{vectorial} / D_{recorrida}$$

donde, *D_{vectorial}*: distancia desde el punto de inicio al punto final en línea recta; y, *D_{recorrida}*: distancia acumulada total desde el punto inicial al final.

2.20 Ensayos de degradación de membrana basal intestinal murina

Se aislaron las membranas basales del peritoneo de ratones según la técnica descrita [171], y se montaron en *transwell* de 6.5 mm de diámetro y sellados con una mezcla 50:50 de cera y parafina. Las células mesoteliales se eliminaron por exposición a hidróxido de amonio (1 N) durante 30 min. Se lavaron extensivamente con PBS 1X, y se esterilizaron con etanol al 70 %. Las células se adicionaron en un volumen de 100 μl encima de las membranas, en tanto, en la cámara de abajo se adicionaron 600 μl de medio de cultivo completo. Tras 1 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, se adicionaron a la cámara de arriba que contenía las células, 100 μl de medio de cultivo completo solo o con PMag (6.25 $\mu\text{g/ml}$). Se incubaron, entonces, durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Al término del tiempo de incubación, se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 min, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con anticuerpo anti-colágenos IV por 3 h a TA. A continuación, se permeabilizaron las células con tritón X-100, 0.05 %, y se incubaron con faloidina-A488 y anticuerpo secundario de cabra anti-conejo-TRITC, y a continuación con DAPI. Para

cuantificar el colágeno IV internalizado por las células, se permeabilizaron antes de incubar con el anticuerpo primario contra el colágeno IV.

Se tomaron imágenes de series de secciones en profundidad de la membrana basal a intervalos de 2 μm con ayuda del microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de 40x/1.4 NA, y grabadas con detector PMT. El área libre de colágeno en las membranas se calculó sobre las proyecciones z 8-bit de las imágenes captadas, y se normalizaron con el área libre de colágeno en membranas basales nativas (sin células). El área degradada por células se calculó según la fórmula:

$$A_{degradada} = (A_{sc\text{tratamiento}} - A_{scMb}) / N_{células}$$

donde, *Ascdegrada*: área degradada (sin colágeno) con tratamiento; *AscMb*: área degradada (sin colágeno) en las membranas basales nativas; y, *Ncélulas*: número de células por campo.

Para cuantificar el colágeno IV internalizado, se calculó con ayuda del programa ImageJ la intensidad de colágeno sobre proyecciones z de las imágenes tomadas hasta la aparición de la membrana basal, y se normalizó con la intensidad de la actina en la misma proyección.

3. Resultados

3.1. Síntesis química y caracterización química-física de las nanopartículas

Con el objetivo de obtener nanopartículas magnéticas con cubierta de polietilenimina, nos basamos en el método de síntesis por co-precipitación en medio alcalino de una mezcla de cloruros hidratados de Fe^{2+} y Fe^{3+} . En el medio de reacción se adicionó conjuntamente polietilenimina (PEI) y Zonyl FSA o Plurónico F-127 como surfactantes. Se mezclaron las soluciones de cloruros de hierros con soluciones de polietilenimina en medio alcalino (NH_4OH) rápidamente a 4°C , y, posteriormente, se homogenizó con ayuda de un agitador durante 2 h y en ambiente libre de oxígeno (N_2 burbujeante). Durante estas 2 h se calentó hasta 90°C o se dejó a temperatura ambiente (TA).

Tras la diálisis exhaustiva (> 72 h) contra agua destilada, se procedió a la caracterización físico-química por dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*). Todas las nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenimina (PEI), cuya nomenclatura a partir de ahora será **PMag**, mostraron un diámetro hidrodinámico superior a los 120 nm (PMag 25Br-Zonyl FSA (90°C) R20:1), alcanzando los 228 nm para el caso de PMag 25Br-Zonyl FSA (TA²⁶) (Tabla R-1). Como era de esperar, la carga superficial demostró ser altamente positiva debido a la presencia de PEI, variando de los + 52.2 de PMag 25Br-Zonyl FSA (90°C) R2:1 hasta los + 67.1 de PMag 25Br-Zonyl FSA

²⁶ TA: acrónimo de temperatura ambiente

(TA). No se testaron las PMag 25Lin-Zonyl FSA (90 °C) por haber mostrado inestabilidad en medio acuoso (formación de precipitado).

Tabla R-1. Características químico-físicas de las nanopartículas determinados por DLS

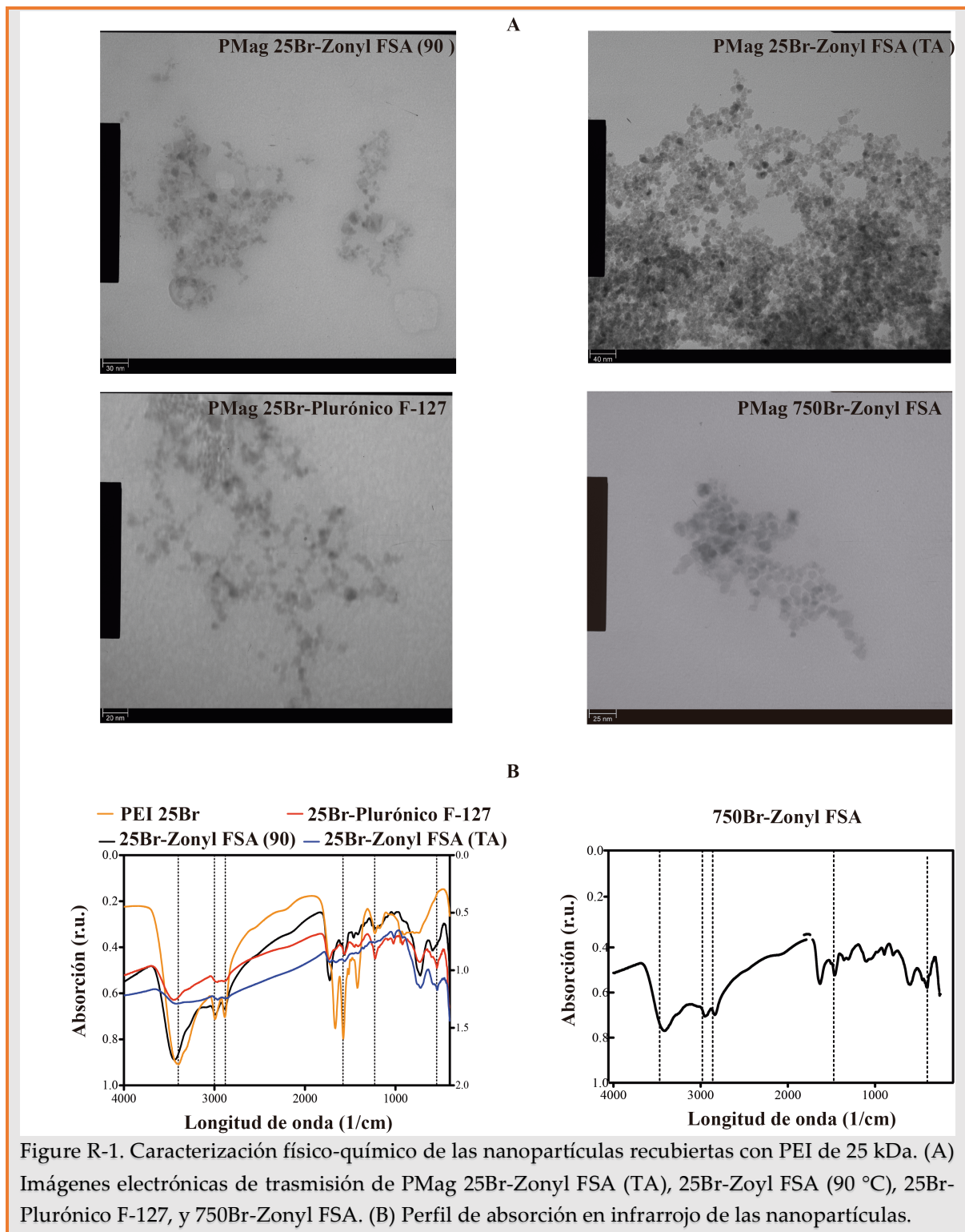
Nanopartícula (PMag)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
25Br-Zonyl FSA (TA [#])	228 ± 1.1	+ 67.1
25Br-Zonyl FSA (90 °C) R2:1*	144 ± 0.2	+ 52.2
25Br-Zonyl FSA (90 °C) R5:1	144	+ 52.2
25Br-Zonyl FSA (90 °C) R10:1	158 ± 3.0	+ 69.4
25Br-Zonyl FSA (90 °C) R20:1	120.2 ± 1.75	+ 54.3
25Br-Zonyl FSA (90 °C) R50:1	134.1 ± 1.71	+ 54.5
25Br-Plurónico F-127	160.5 ± 1.4	+ 61.7
750Br-Zonyl FSA	139.3 ± 1.3	+ 56.8

[#] TA: temperatura ambiente; * R: proporción de PEI: Zonyl FSA (g/ml). El protocolo original utilizó 2:1

El análisis por microscopía electrónica de transmisión reveló la presencia de un núcleo de óxido de hierro de aproximadamente 11 nm para los caso analizados de PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), 25Br-Zonyl FSA, y 25Br-Pluronic F-127 (*Figura R-1, A*).

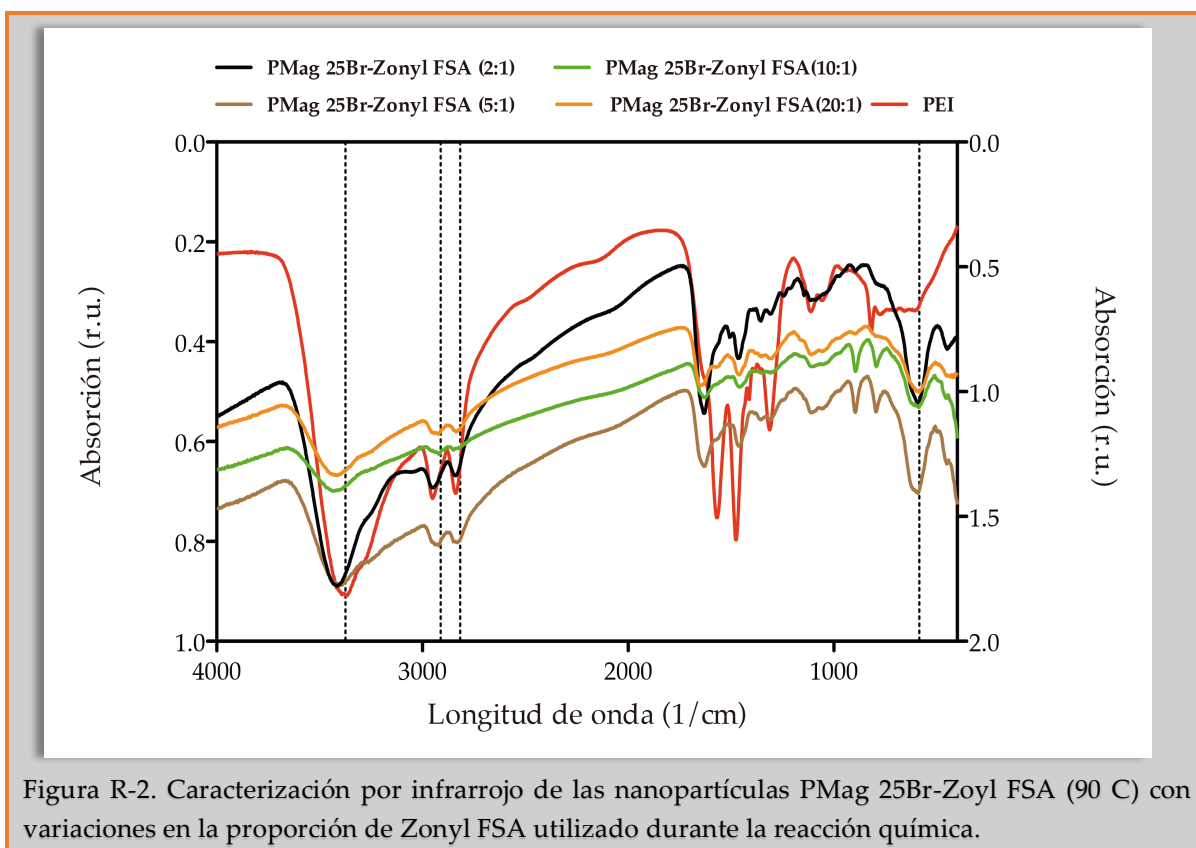
Con el objetivo de analizar el efecto de la disminución del surfactante Zonyl FSA sobre las propiedades de las PMags, variamos la proporción utilizada durante la reacción química de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) manteniendo constante la cantidad de PEI usado. Ni el diámetro hidrodinámico ni la carga superficial parecieron depender de la proporción de surfactante utilizado (*Tabla R-1*).

Posteriormente, para confirmar la presencia del polímero PEI en la estructura de las nanopartículas magnéticas obtenidas, sometimos las PMags a estudio de absorción de infrarrojo. Un pico de absorción intensa se detectó en la franja de frecuencias 2800-3000 cm^{-1} y alrededor de 1500 cm^{-1} del espectro, que corresponden a la energía vibracional de residuos alquenos (*Figura R-1, B*). Un pico característico de absorción de mediana intensidad se observó a en el rango de frecuencia de 3300-3600 cm^{-1} , que corresponde a la energía vibracional de enlaces N-H de las aminas. Igualmente, encontramos otros picos de absorción típicas de aminas primarias que cubren el rango de 1200-1700 cm^{-1} (*Figura R-1, B*). La intensa absorción en el rango de frecuencias de 500-600 cm^{-1} en todos los casos, pero no para PEI, se debe a la presencia del enlace Fe-O (*Figura R-1, B*).



El estudio del difractograma de las PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 mostró la presencia de picos característicos del perfil de espín inverso presentes en

compuestos como la maghemita y goethita (*Figura R-3, A*). El perfil de absorción en el espectro de infrarrojo para las PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) obtenidas con variaciones en la proporción de Zonyl FSA durante la síntesis química, demostró la presencia del polication al mostrar los picos de absorción antes mencionados (*Figura R-2*).



El análisis [termogravimétrico](#)²⁷ para tres de las nanopartículas recubiertas con PEI de 25 kDa, PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), 25Br-Zonyl FSA (TA) y 25Br-Plurónico F-127, arrojó un porcentaje de contenido orgánico de 51, 10, y 65 %, respectivamente (*Figura R-3, B*). PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 mostraron una magnetización máxima de 47 y 28 emu/g (*Figura R-3, C*), diferencia probablemente debida al contenido de goethita de PMag 25Br-Plurónico F-127 (*Figura R-3, A*).

²⁷ **Termogravimetría:** método de estudio de la masa o peso de sustancias basado en la descomposición térmica

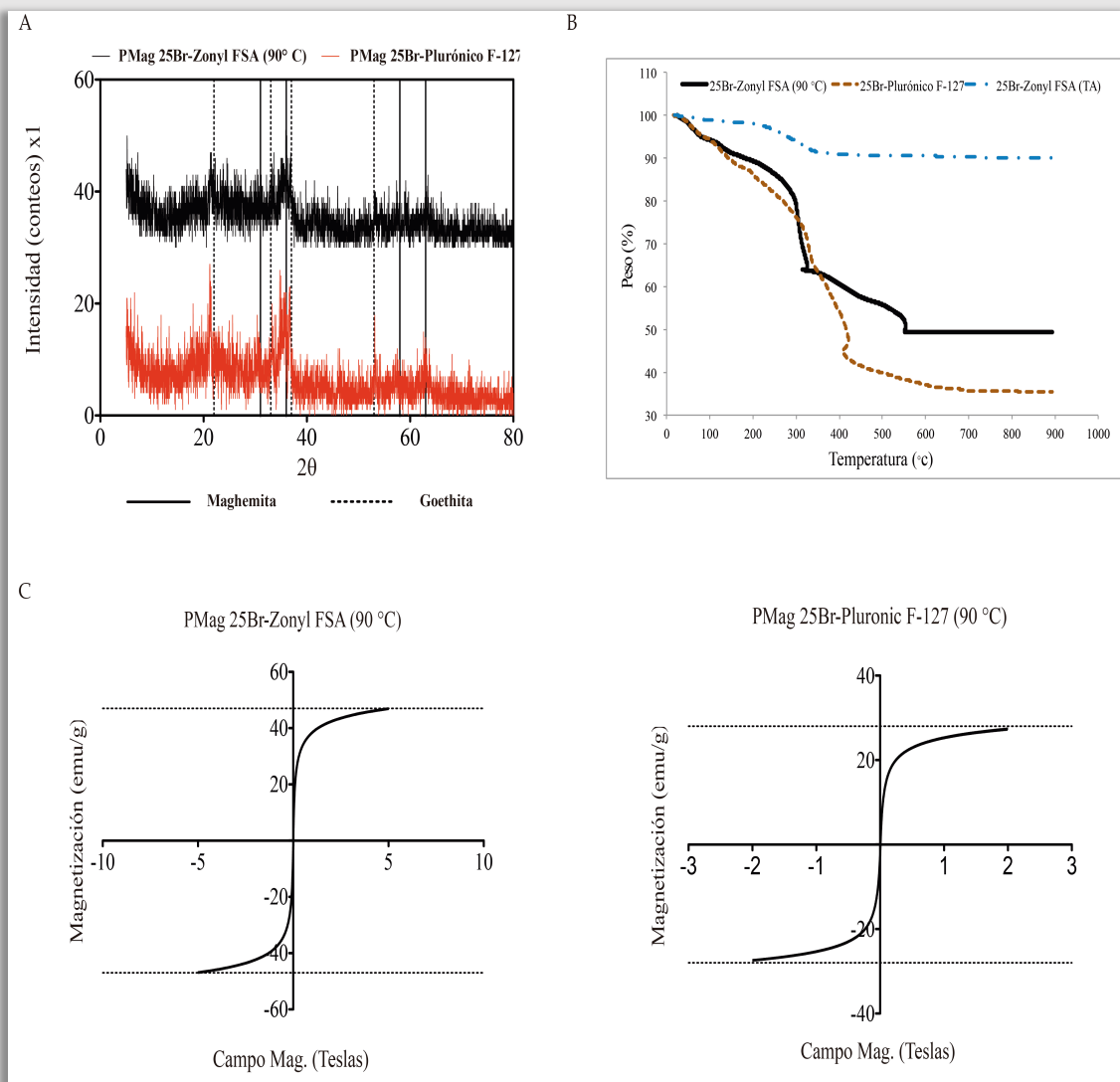


Figura R-3. Caracterización físico-química de las nanopartículas recubiertas con PEI de 25 kDa. (A) Difractograma de 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Pluronic F-127, mostrando la presencia de maghemita y goethita. (C) Curvas de histéresis de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Pluronic F-127.

3.2. Citotoxicidad y eficiencia de transfección

3.2.1. Citotoxicidad contra líneas tumorales

Para determinar cómo las PMags afectan la viabilidad celular, incubamos las líneas celulares Pan02 (adenocarcinoma pancreático de ratón), NIH 3T3 (fibroblastos murinos), HeLa (tumor cervical humano), B16F10 (melanoma murino), y HEK293 (células embrionarias de riñón humano) con concentraciones crecientes de PMag 25Br-Zonyl FSA

(TA), PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), PMag 25Br-Pluronic F-127, y PMag 750Br-Zonyl FSA. El tiempo de incubación fue de 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. Puesto que un componente importante de las PMags es PEI que ha demostrado ser citotóxico *per se*, era de esperar un impacto negativo sobre las células a altas concentraciones de nanopartículas. Todas las PMags ensayadas mostraron citotoxicidad creciente en la medida en que aumentamos las concentraciones de nanopartículas. Sin embargo, PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), pese a estar compuesta por PEI, no indujo toxicidad significativa en estas células (*Figura R-4*). No obstante, su poco porcentaje de material orgánico podría explicar esta diferencia. La máxima concentración a la que no observamos toxicidad apreciable fue de 6.25 µg/ml.

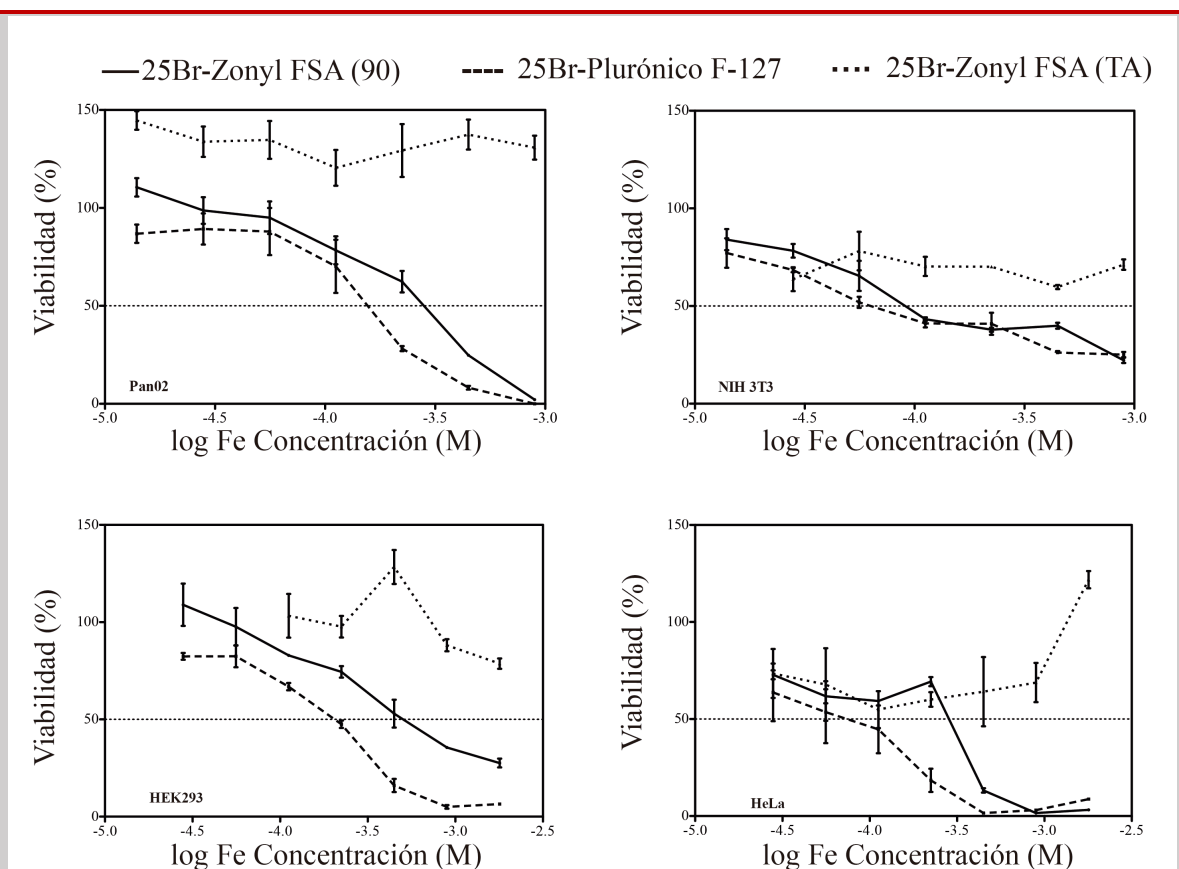
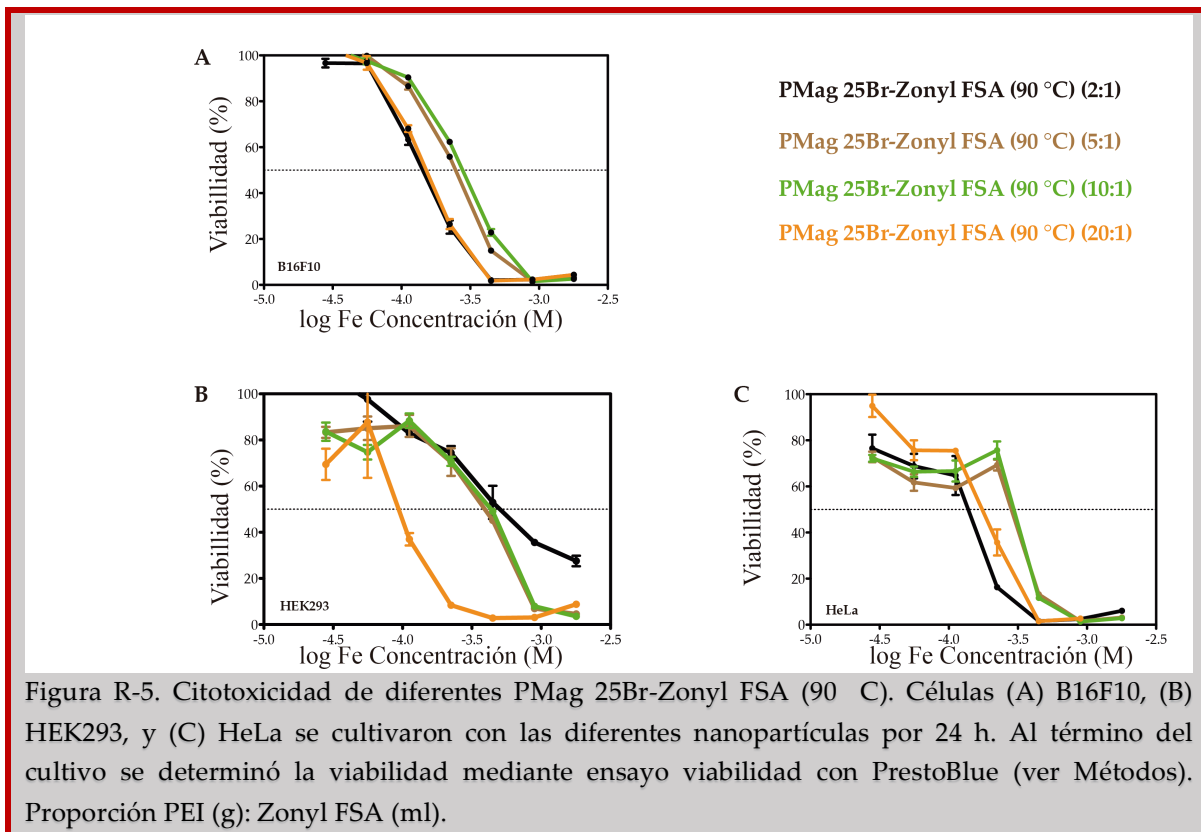


Figura R-4. Citotoxicidad de diferentes PMags . Células de Pan02, NIH 3T3, HEK293 y HeLa se cultivaron con las diferentes nanopartículas por 24 h. Al término del cultivo se determinó la viabilidad mediante ensayo de viabilidad con PrestoBlue (ver Métodos).

Al comparar la citotoxicidad de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) obtenidas a diferentes proporciones de PEI (g): Zonyl FSA (ml), observamos una ligera disminución de la toxicidad contra las células B16F10 y HeLa para los casos de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (5:1) y (10:1) (*Figura R-5*). Tal resultado no se observó en el caso de las células HEK293.



3.2.2. Internalización y eficiencia de transfección

Para probar el concepto de PMag como nanotransportador de moléculas de ADN o ARN, utilizamos el plásmido codificante para la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*) pEGFP. Primero, co-incubamos el plásmido (30 µg) con concentraciones crecientes de las diferentes PMags, hasta una proporción másica de Fe/pEGFP de 6.4. A continuación, realizamos ensayo de retardo en gel de agarosa al 1 % para determinar los niveles relativos de plásmido que migran.

La mayoría de las PMags analizadas fueron capaces de empaquetar el plásmido impidiendo su migración en gel entre las proporciones de 0.2 a 0.4 (*Figura R-6, A*). Sin embargo, la PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) mostró 100 % de conjugación con el plásmido a 3.2 de proporción, sugiriendo su baja capacidad de conjugación probablemente debido a su bajo contenido orgánico (*Figura R-2, B*). Ajustando a una curva de unión los porcentajes de ADN conjugado a las PMags contra la concentración de estas últimas, obtuvimos valores aproximados de las constantes de disociación (K_D) para tales equilibrios químicos. La K_D es inferior a $12 \cdot 10^{-5}$ M para todos los casos, excepto PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), cuyo análisis arrojó un valor superior igual a $91.27 \cdot 10^{-5}$ M (*Figura R-6, B*).

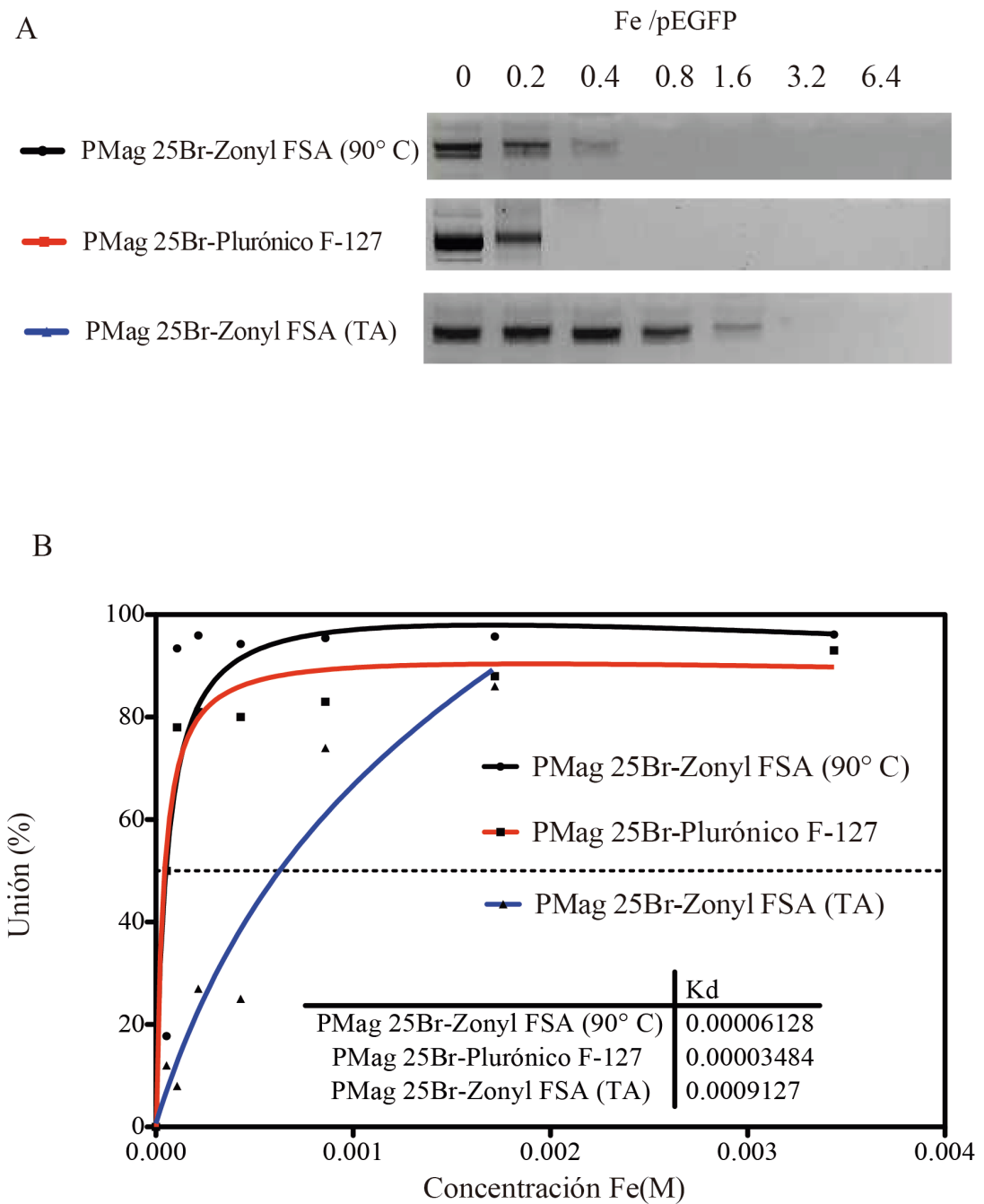
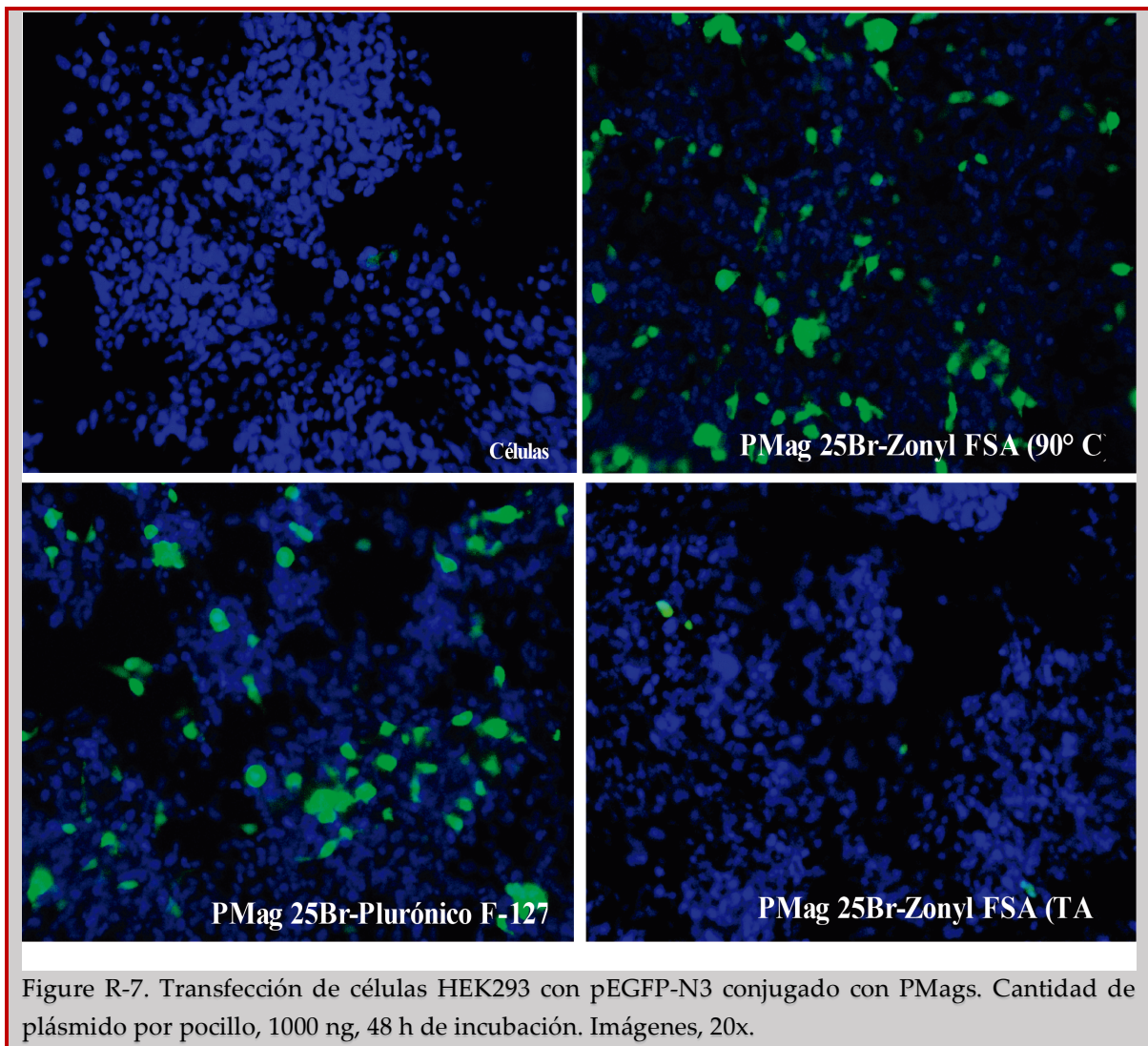


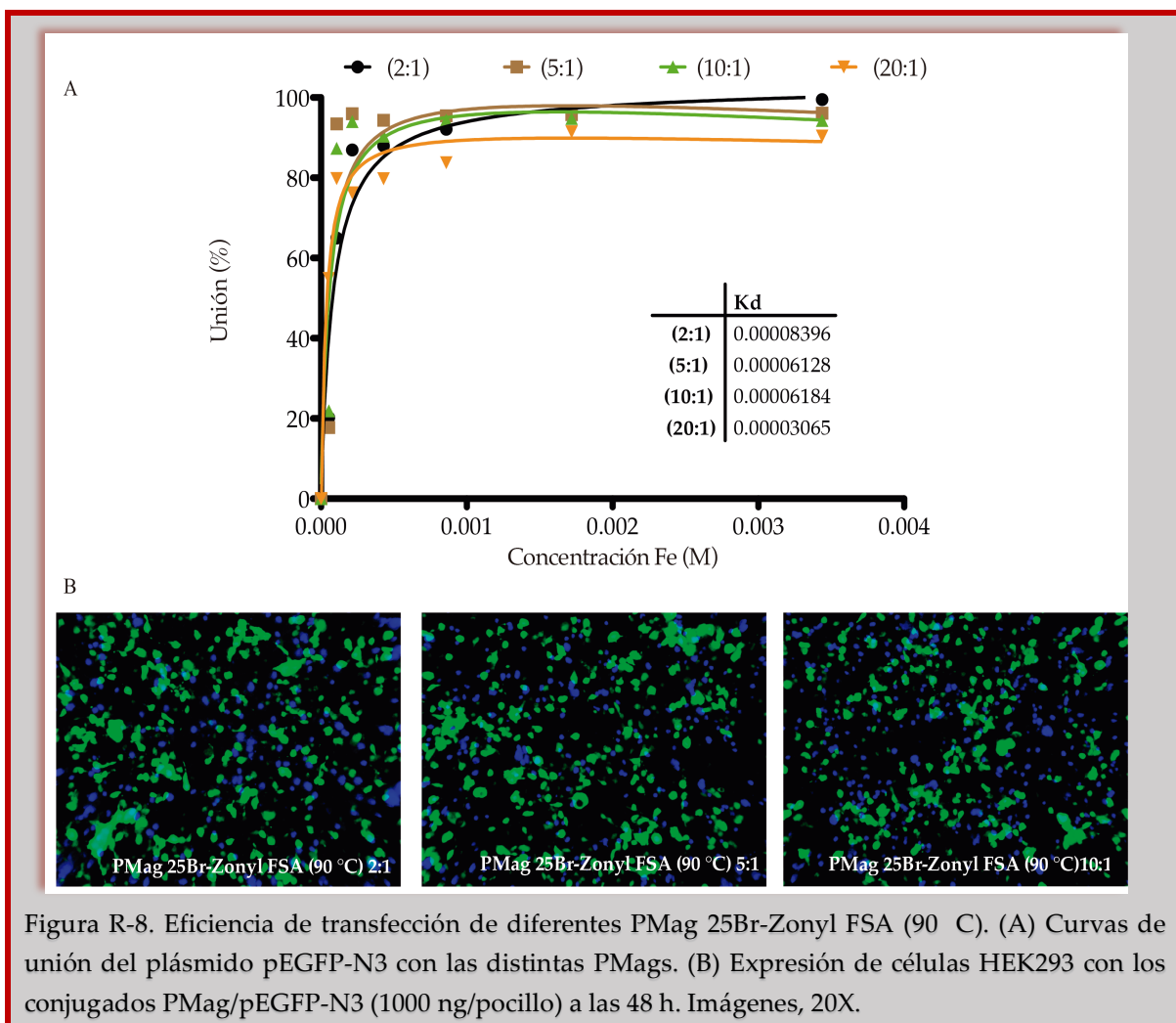
Figura R-6. Empaquetamiento de plásmido pEGFP-N3 por PMags. (A) Ensayo de retardo en gel para conjugados de PMags. (B) Curvas de unión de pEGFP-N3 a PMags. Inserto: los valores de K_D tras ajuste de los valores.

Conocidas las proporciones másicas óptimas para la conjugación del plásmido pEGFP, a continuación realizamos ensayos de transfección con los conjugados obtenidos, para una

cantidad final de plásmido de 1000 ng por pocillo. Los niveles de transfección de células HEK293 variaron de un 20 a un 40 % del total a las 48 h para el caso de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y PMag 25Br-Plurónico F-127. No obstante, el conjugado con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no fue capaz de transfectar dichas células (*Figura R-7*).

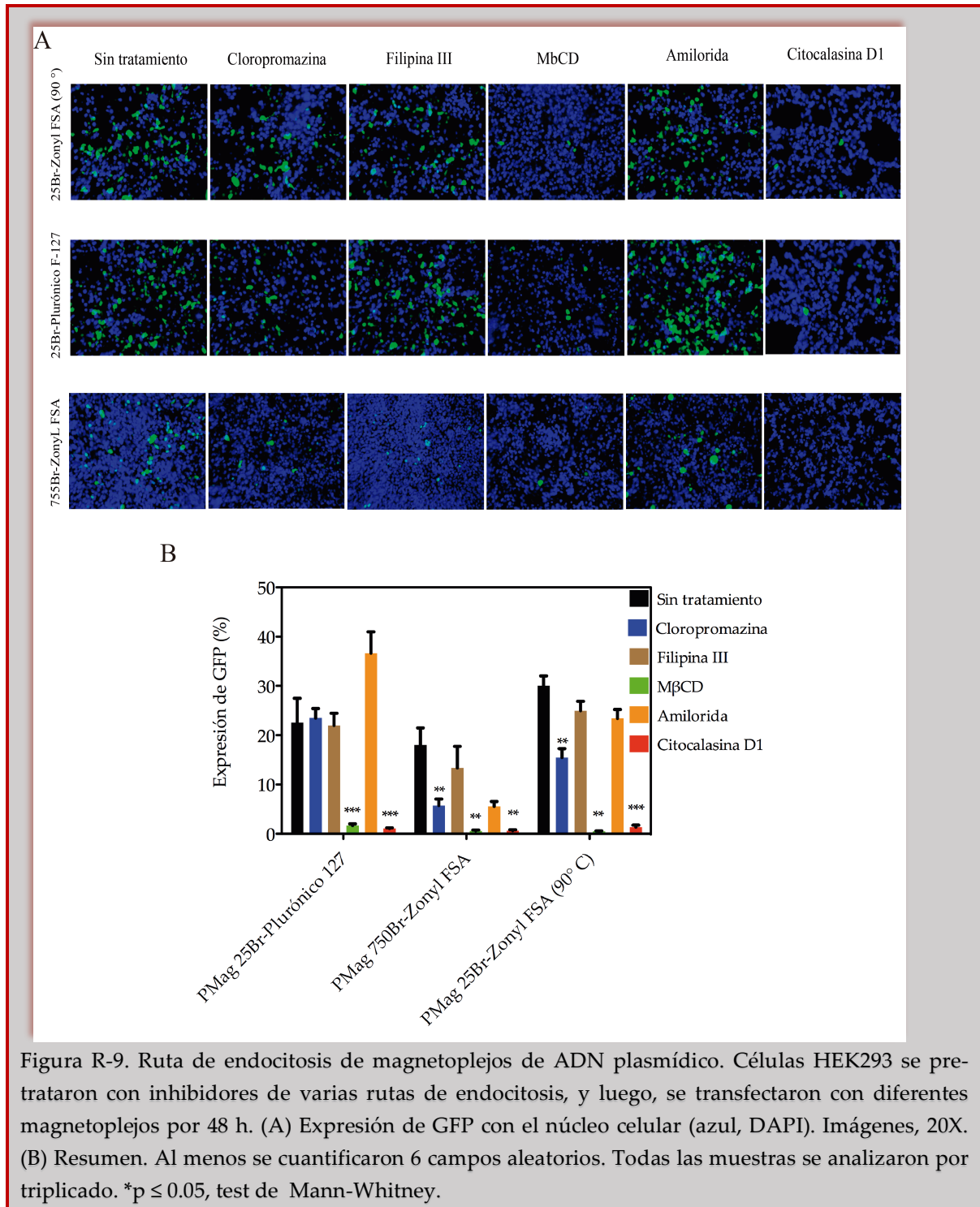


Las variantes de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) obtenidas con menor proporción de PEI, mostraron una eficiencia similar de conjugación de ADN y de transfección de células HEK293 entre ellas (*Figura R-8*).



Con el objetivo de estudiar el mecanismo de endocitosis de los conjugados PMag/pEGFP, las HEK293 fueron previamente tratadas durante 2 h con inhibidores de rutas de endocitosis dependiente de clatrina (Cloropromazina), de caveolina (Filipina III y Metil- β -ciclodextrina), de macropinocitosis (Amilorida), y de la polimerización de actina (Citocalasina D) como control de inhibición de la actividad endocítica. Posteriormente, fueron transfectadas con los conjugados PMag/pEGFP. Los conjugados estudiados de PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), 25Br-Plurónico F-127, y 750Br-Zonyl FSA mostraron una capacidad disminuida de transfección tras el tratamiento de las células con Metil- β -ciclodextrina, y en menor medida, con Cloropromazina (*Figura R-9*), sugiriendo la

dependencia de la internalización, y por consiguiente, la transfección de la ruta endocítica dependiente de caveolina.



Para confirmar estos datos, pre-tratamos por 2 h células HeLa con los antes mencionados inhibidores de las rutas de endocitosis, y, posteriormente las co-incubamos durante 4 h con magnetoplejos PMag 25Br-Plurónico F-127/pGL-Luc-YOYO1 (*Figura R-10, A*) o PMag 750Br-Zonyl FSA/pGL-Luc-YOYO1 (*Figura R-10, B*), obtenidos por conjugación electrostática. El plásmido pGL-Luc está marcado fluorescentemente con YOYO1 (verde al microscopio de fluorescencia). Tras lavados exhaustivos con PBS 1X, visualizamos los magnetoplejos asociados/internalizados por las células HeLa. El pre-tratamiento con Filipina III y Metil- β -ciclodextrina redujo significativamente la fluorescencia de YOYO1 asociada a las células HeLa para ambos tipos de magnetoplejos (*Figura R-10*).

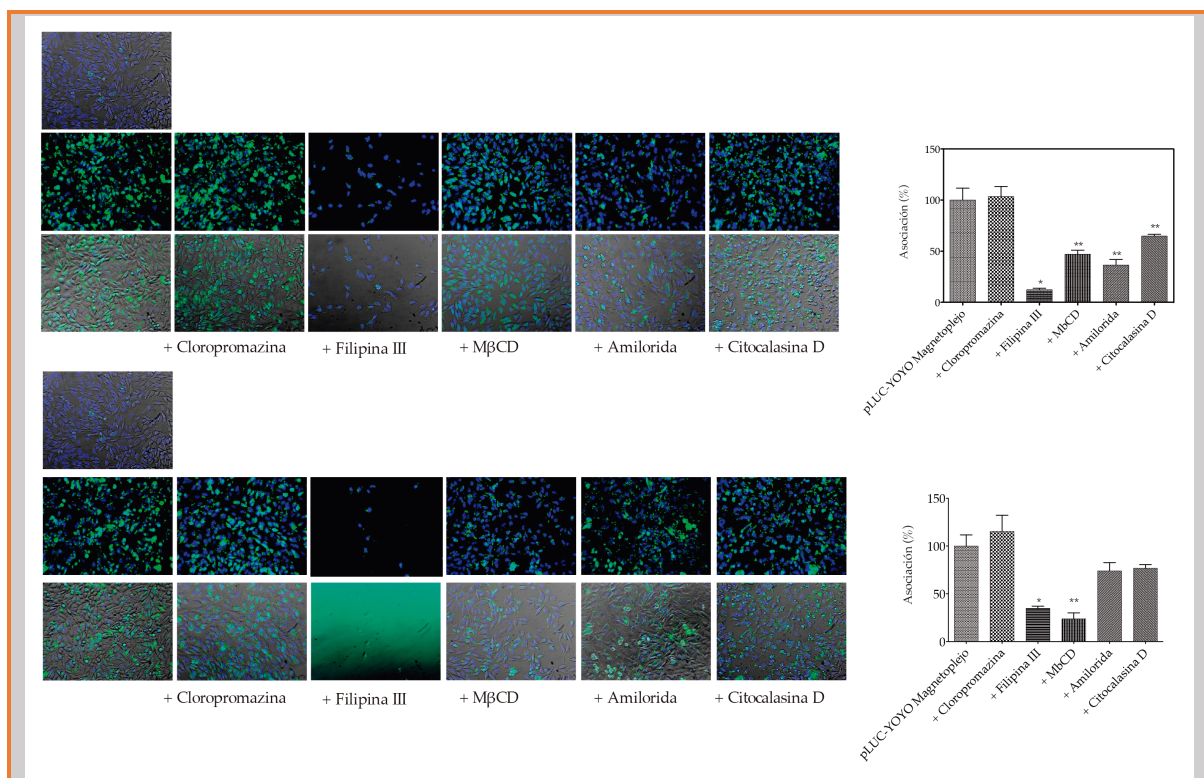
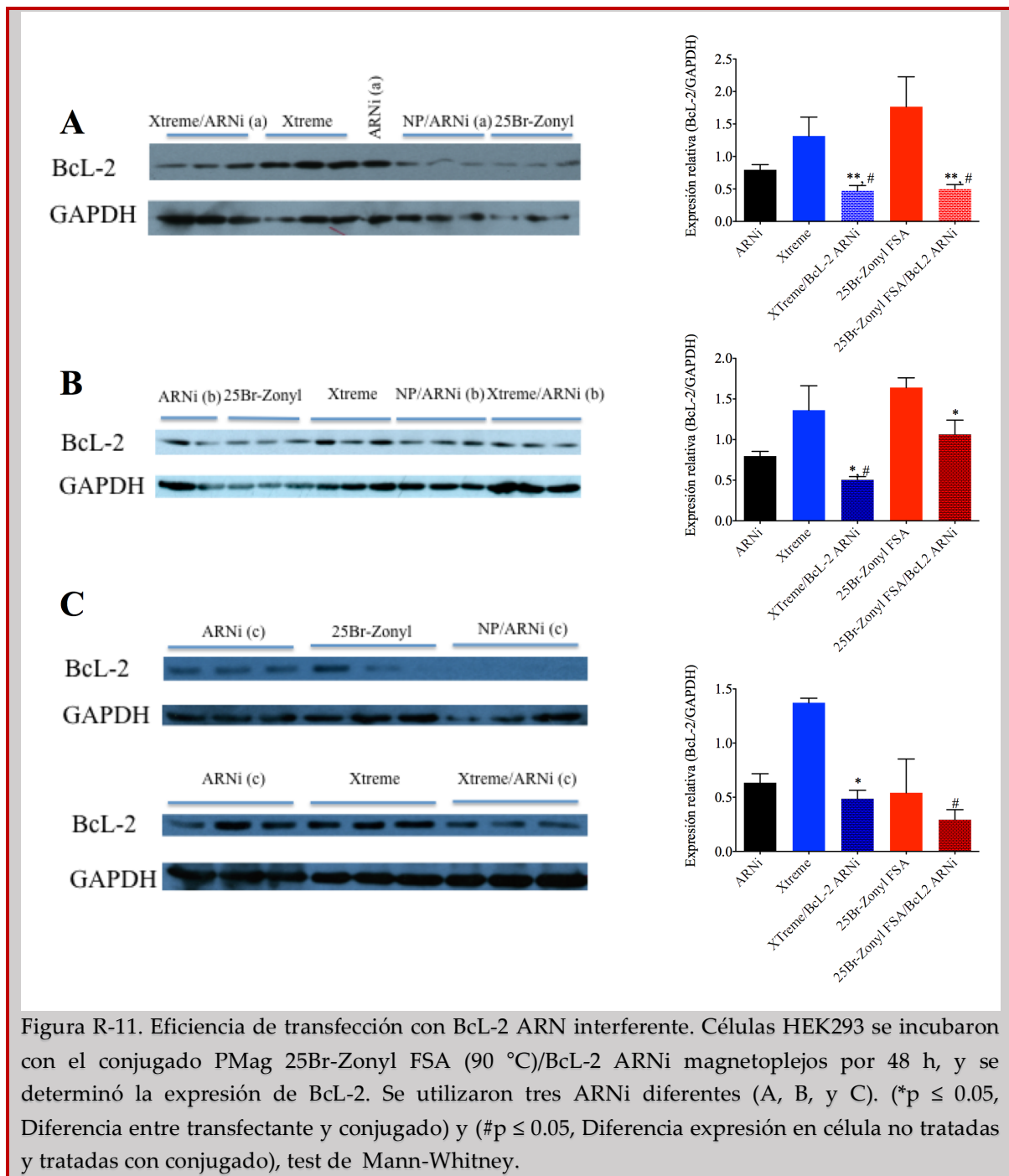


Figura R-10. Internalización/asociación de magnetoplejo de pGL-Luc/YOYO-1/PMag por células HeLa. Las células se pre-trataron por 2 h con los inhibidores y posteriormente 4h con magnetoplejo con (A) PMag 25Br-Pluronic F-127 o (B) PMag 750Br-Zonyl FSA. Cantidad final de plásmido por pocillo es de 500 ng. Se visualizan los magnetoplejos (verde, YOYO-1) y el núcleo celular (azul, DAPI). Imágenes, 20X. Al menos se cuantificaron 6 campos aleatorios. Todas las muestras se analizaron por triplicado. * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, test de Mann-Whitney.

Notablemente, el pre-tratamiento con Amilorida afectó la asociación de ambos complejos magnéticos, llegando a ser significativa para el caso PMag 25Br-Plurónico F-127/pGL-Luc-YOYO1, sugiriendo el involucramiento parcial de la macropinocitosis. Estos resultados corroboran los obtenidos con el ensayo de expresión de GFP.

Como prueba de concepto del uso de estos nanotransportadores en la terapia con ARN interferentes, ARNi (del inglés, *interefering RNA*), conjugamos tres ARNi (colaboración con el laboratorio del Dr. Álvaro Somoza, IMDEA Nanociencia, Madrid) específicos contra el transcrito de Bcl-2 humano (ver Materiales y métodos).



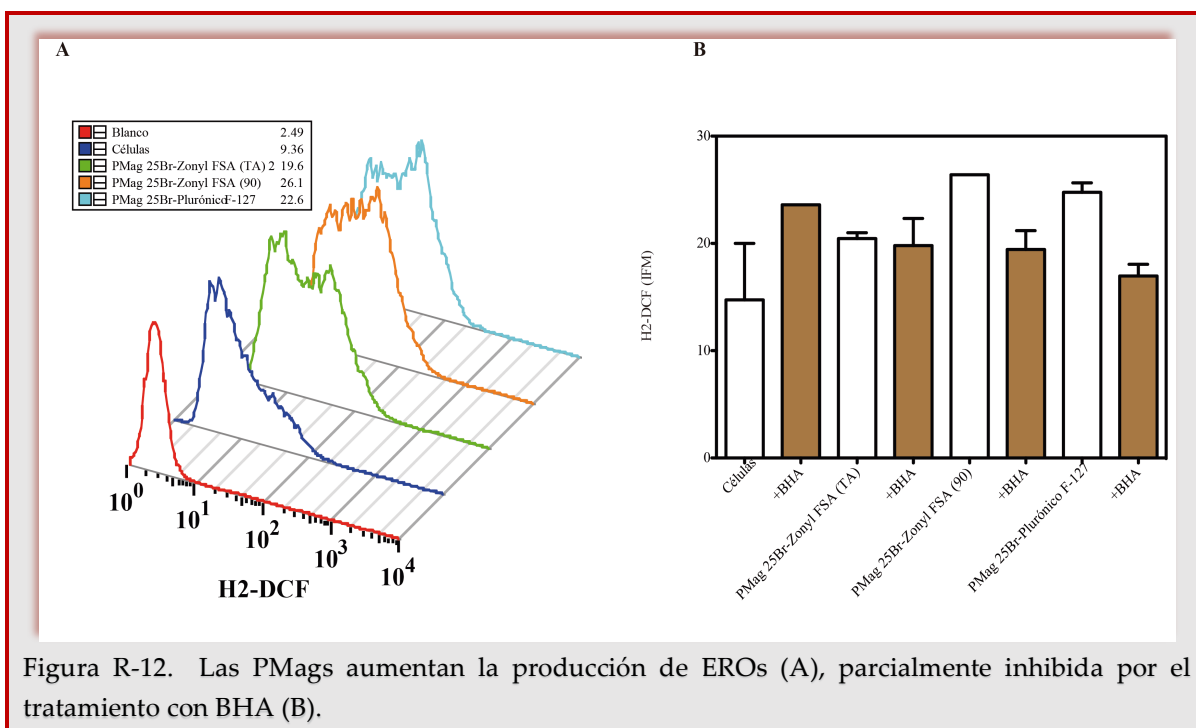
Los tres magnetoplejos de Bcl-2 ARNi con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) indujeron la disminución de la expresión de Bcl-2 a las 48 h en las células HEK293 comparados con el tratamiento con las nanopartículas (*Figura R-11*). Tomamos como control de transfectante

el reactivo *X-tremeGene* de Roche. En resumen, los complejos magnéticos son capaces de transfectar células HEK293 con ARN interferentes.

3.3. Bioactividad intrínseca en células tumorales (Pan02)

3.3.1. Las PMags activan la respuesta anti-estrés oxidativo y del metabolismo del hierro

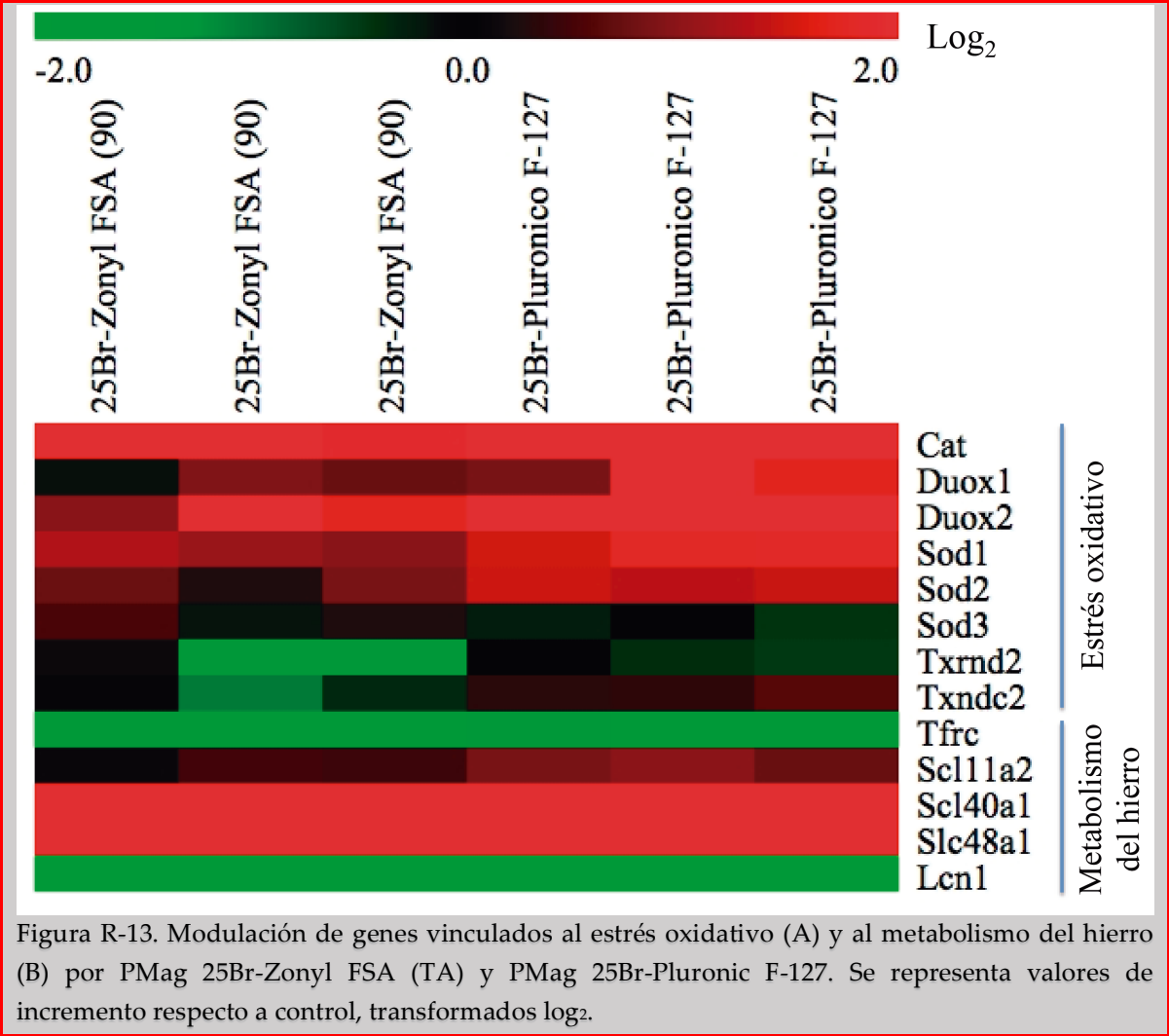
Observamos que la producción de EROs²⁸ (medida con citometría de flujo por la intensidad de la sonda específica de EROs H₂-DCF₂) es aumentada en presencia de las nanopartículas magnéticas (*Figura R-12*). Debido a que las nanopartículas magnéticas inducen esta sobre-producción de EROs, es comprensible que se activen mecanismos moleculares anti-estrés oxidativo. Con el objetivo de determinar tales mecanismos, co-incubamos células Pan02 con PMag 25Br-Zonyl FSA y 25Br-Plurónico F-127 a la concentración subletal de 6.25 µg/ml durante 2, 6 y 24 h.



Nos enfocamos en PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127. Ambos tipos de nanoparticulados inducen el aumento de los transcritos para varias enzimas vinculadas a

²⁸ EROs: Especies Reactivas del Oxígeno

la regulación redox, como *CAT* (Catalasa), *SOD1*, *SOD2* (Dismutases de superóxidos), y, *DUOX1* y *DUOX2* (Oxidasa dual) (*Figura R-13, A*). Los niveles de transcritos de *SOD3*, así como de *Txrnd2* y *Txndc2*, no varían sustancialmente cuando las células son tratadas con PMag 25Br-Plurónico F-127, aunque los transcritos de *Txrnd2* y *Txndc2* tienden a disminuir tras el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C).



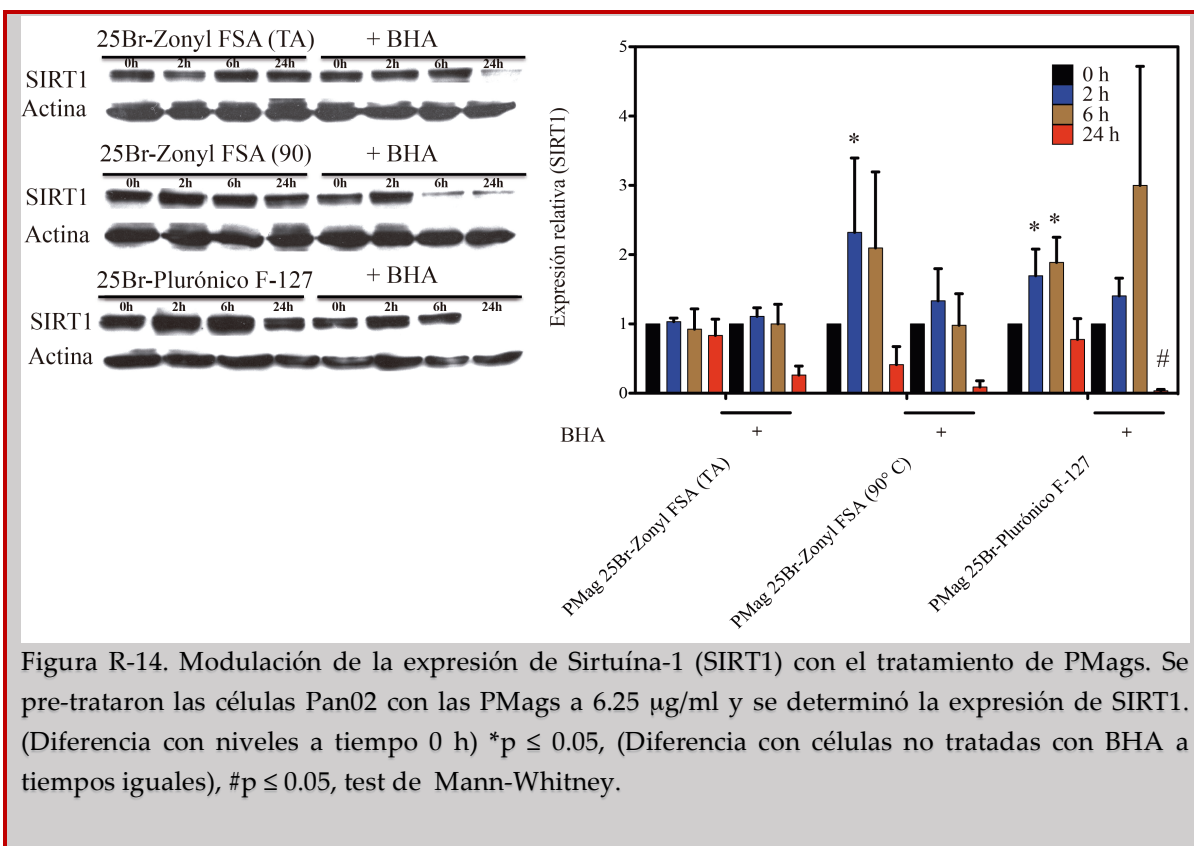
Una vez internalizadas, las nanopartículas magnéticas son degradadas dando como resultado un incremento de cationes Fe²⁺ y Fe³⁺, este último reducido al primero por las condiciones redox intracelulares. Con todo ello, es plausible que el metabolismo del hierro sea modulado por las internalización de tales nanopartículas. Para analizar el efecto sobre el metabolismo del hierro, las células Pan02 fueron tratadas como en el caso

anterior, y se determinó la expresión de varios genes vinculados con el metabolismo del hierro.

Los niveles de transcritos del transportador de metales divalentes-1 (DMT1, del inglés *divalent metal transporter-1*) y ferroportina-1 (*Slc40a1*) aumentan al cabo de 24 h de tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA Y 25Br-Plurónico F-127 (*Figura R-13, B*). Se observó un efecto similar para el transcrito del transportador de grupos hemo (*Slc48a1*), que codifica para una proteína responsable del transporte de grupos hemo del endosoma al citosol. Contrariamente, el receptor de transferrina (*Tfrc*) y de lipocalina-2 (*Lcn2*) disminuyen.

Una de los factores que responden rápidamente al estrés oxidativo son las sirtuínas, particularmente Sirtuína-1 (SIRT1), que es regulada por la enzima de reparación de ADN dependiente de NAD^+ ²⁹, poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP1). En condiciones de estrés oxidativo, con la subsecuente disminución de los niveles de NAD^+ , SIRT1 sufre modificaciones post-traduccionales que incluyen fosforilaciones, S-nitrosilaciones, SUMOilaciones y carboxilaciones, muchas de las cuales conllevan a su degradación. Cuando las células Pan02 fueron tratadas con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) o PMag 25Br-Plurónico F-127, los niveles de SIRT1 aumentaron a las 2 y 6 h, y retornaron a sus valores iniciales a las 24 h (*Figura R-14*); sin embargo, PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no afectó la expresión de SIRT1.

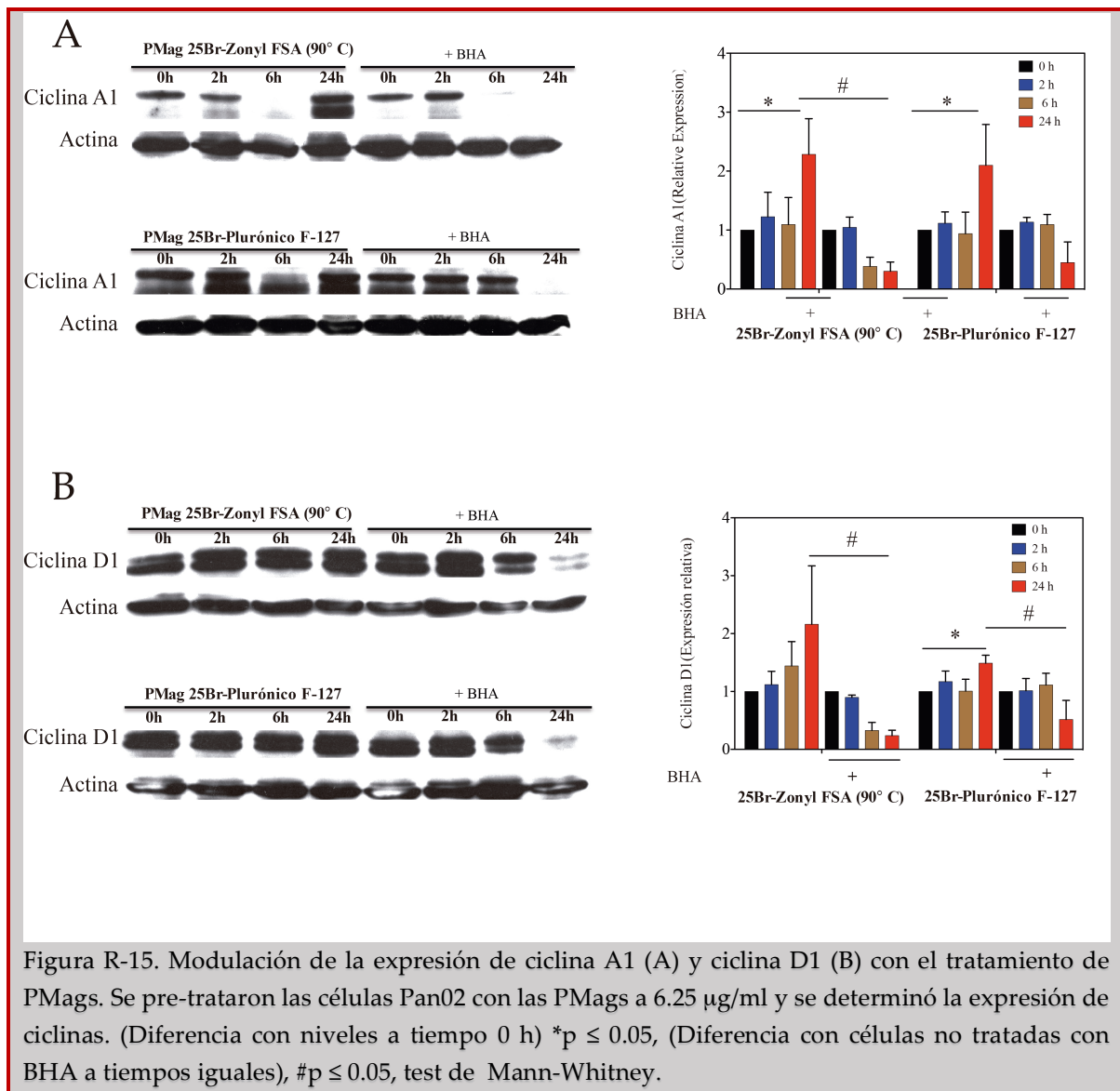
²⁹ NAD^+ : del inglés, *Nicotinamide Adenosine Diphosphate*



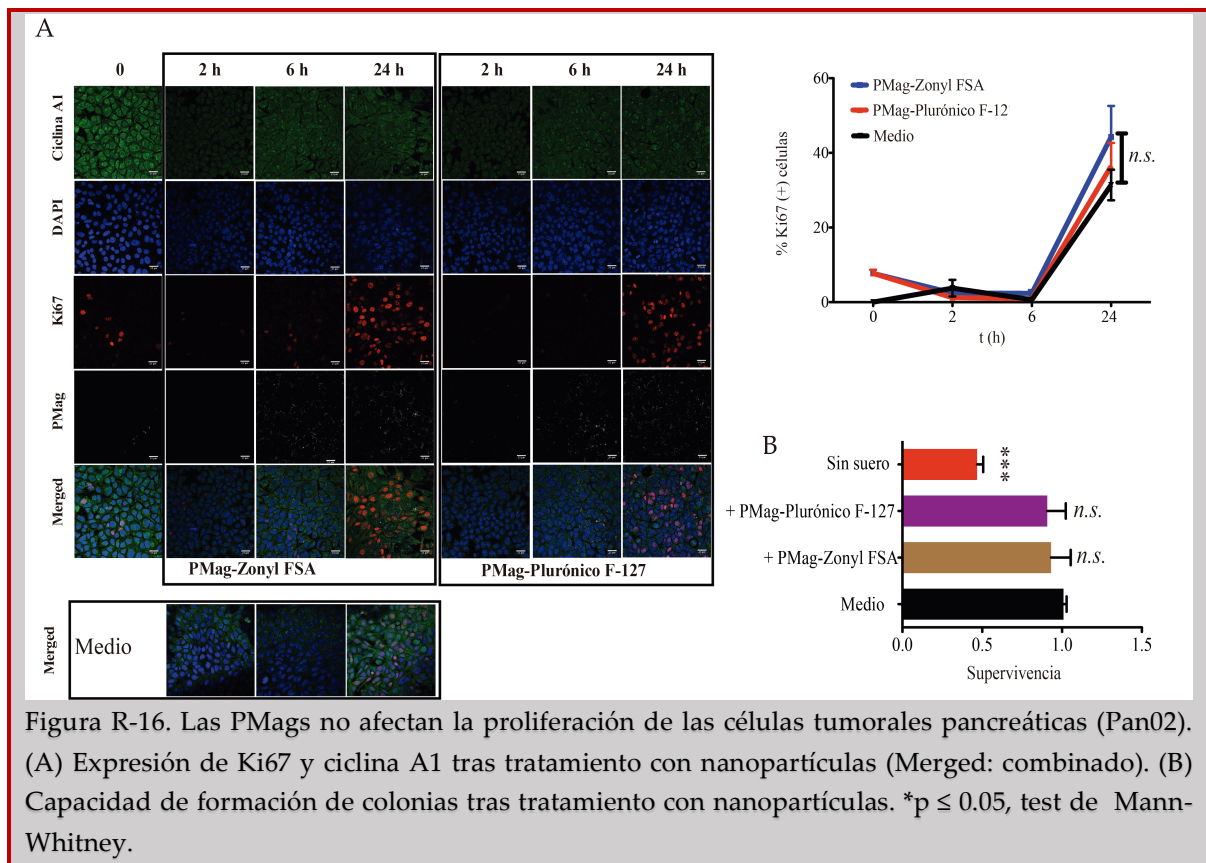
3.3.2. Las PMags no afectan la capacidad proliferativa de las células tumorales pancreáticas

Puesto que se quiere aplicar estos nanosistemas en la terapia génica en patologías del cáncer, determinamos como estas nanopartículas por sí solas afectan la biología de las células tumorales pancreáticas. Seleccionamos la línea Pan02 como modelo de adenocarcinoma pancreático por ser uno de los modelos tumorales estudiados en nuestro laboratorio anteriormente [58]. Nos enfocamos en el efecto sobre la proliferación e invasión/migración de las células tumorales, ambos procesos vitales en la carcinogénesis y progresión tumoral.

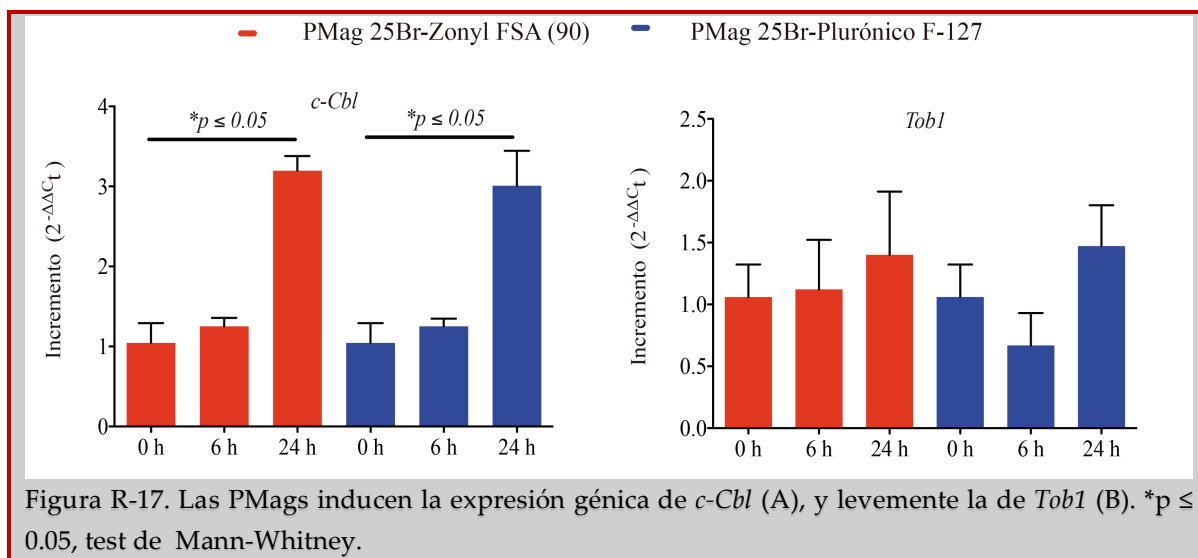
Cuando las células Pan02 fueron tratadas con PMags, se observó un incremento significativo en la expresión de dos factores pro-proliferativos, ciclina A1 (Figura R-15, A) y ciclina D1 (Figura R-15, B). Sin embargo, este incremento no afectó la capacidad proliferativa de las células comparadas con las células no tratadas con nanopartículas según la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 (Figura R-16, A), ni redujo su capacidad de formación de colonias (Figura R-16, B).



La sobre-expresión tanto de ciclina A1 y ciclina D1 parece depender parcialmente de la producción de EROs, puesto que las células pre-tratadas con el reactivo BHA, que reacciona con EROs provocando su reducción parcial (*Figura R-12*), no mostraron incremento de estos factores (*Figura R-15*).



Además, el tratamiento con PMags incrementó la expresión génica de c-Cbl, una ligasa E3 de ubiquitina conocida por inhibir la proliferación de células tumorales (*Figura R-17, A*). Otro factor que inhibe este proceso, Tob1, aumentó levemente a las 24 h de tratamiento con nanopartículas (*Figura R-17, B*). Ambos factores están también involucrados en la inhibición de la migración celular, por lo cual, investigamos el efecto que el tratamiento con PMag tiene sobre la capacidad migratoria de las células tumorales pancreáticas.



3.3.3. Las PMags inhiben la migración/invasión de las células tumorales pancreáticas

Para investigar la capacidad de migración de las células tumorales con el tratamiento con PMag, realizamos ensayos de cierre de "herida" (del inglés, *wound healing assay*). Se rasgaron las monocapas celulares en cultivo confluyente de Pan02 y se trataron las células con PMag (6.25 $\mu\text{g/ml}$) y se monitorizó los bordes de la rotura durante 18 h. La invasión de las células tumorales pancreáticas fue inhibida por el tratamiento de las nanopartículas, disminuyendo de más de 60 % de cierre en las células sin tratamiento a 40 % con PMag 25Br-Plurónico F-127, 20 % con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), y 30 % con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) (Figura R-18, A y B). Sin embargo, la velocidad del frente celular no correlacionó con lo anterior, aumentando para el caso de las células tratadas con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) (Figura R-18, C).

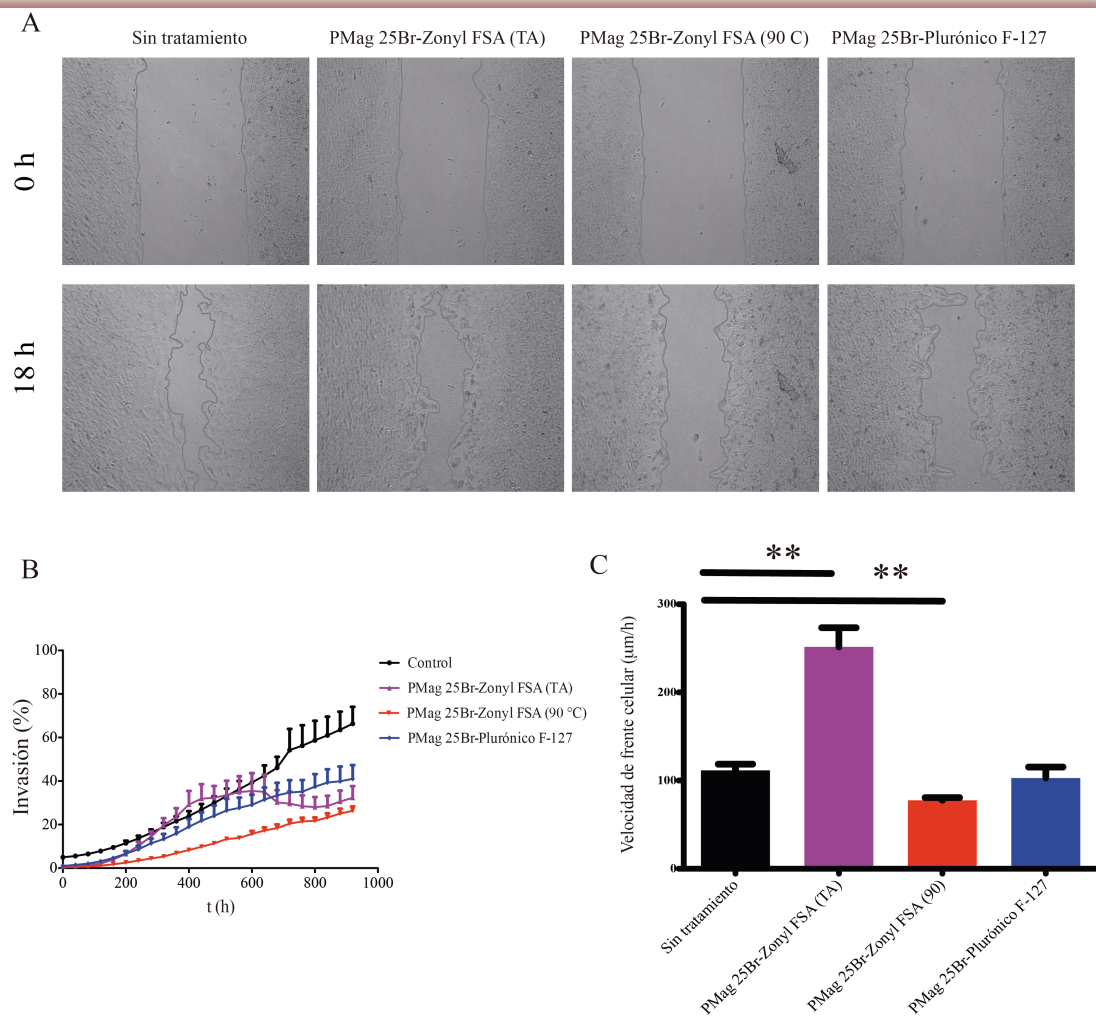


Figura R-18. Capacidad invasiva de las células tumorales pancreáticas con tratamiento con PMag. (A, B) Las células Pan02 se trataron con nanopartículas y se monitoreó el cierre de herida hasta las 18 h. (C) Velocidad de frente celular (ver Materiales y métodos) . ** $p \leq 0.01$, test de Mann-Whitney

Aunque el tratamiento con nanopartículas no afectó el índice de migración direccional (Figura R-19, B), sí disminuyeron la distancia recorrida por las células individualmente (Figura R-19, A y C). Por tanto, las PMags inhiben la migración de las células tumorales pancreáticas, Pan02.

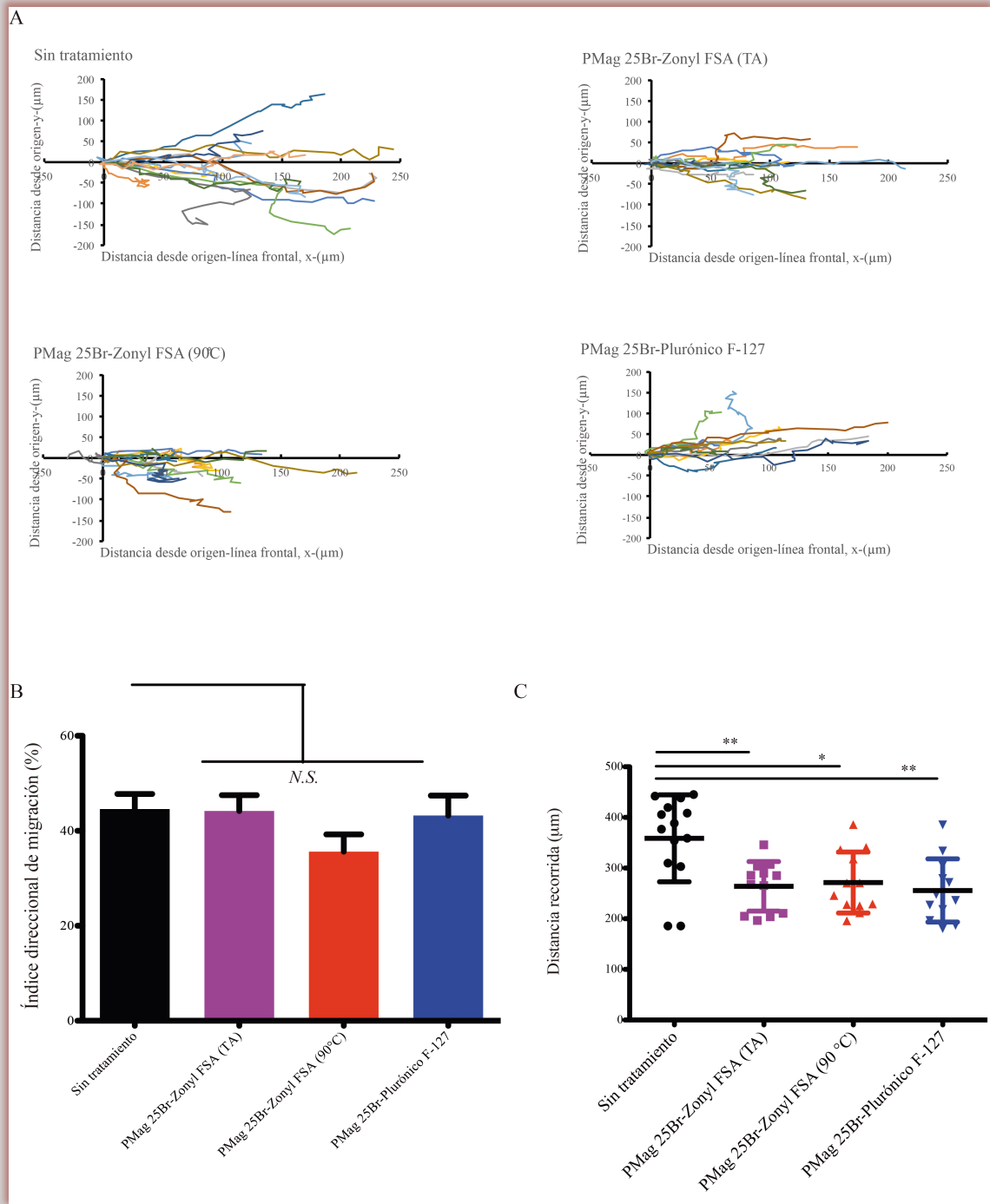
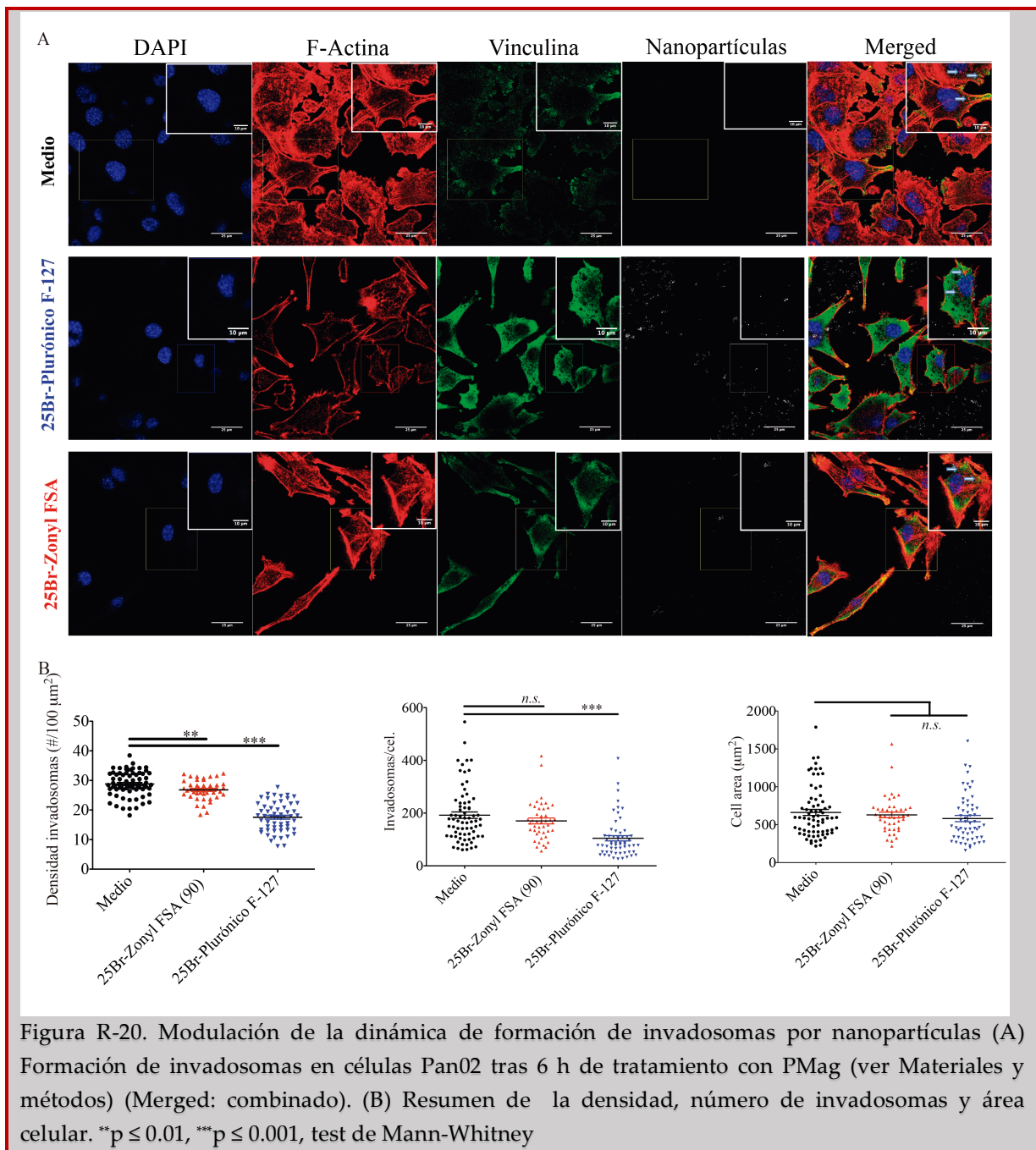


Figura R-19 (A) Migración de células individuales tratadas o no con nanopartículas. (B) índice calculado de migración direccional; y, (C) distancia recorrida por células individuales (ver Materiales y métodos). * $p \leq 0.05$, test de Mann-Whitney.

3.3.4. *Las PMags modulan la dinámica de formación de invadosomas en células tumorales del páncreas*

Para analizar posibles causas del efecto de las nanopartículas sobre la capacidad invasiva de las células tumorales pancreáticas, determinamos cómo afectan la dinámica de los invadosomas, estructuras de vital importancia en la capacidad migratoria de las células tumorales. Nos enfocamos en dos de las nanopartículas con mayor capacidad inhibitoria de la migración, PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) Y 25Br-Plurónico F-127. El tratamiento durante 6 h con ambas nanopartículas redujo la densidad de los invadosomas en las células Pan02 (*Figura R-20, A*), provocado por una disminución del número de estas estructuras que es independiente del área celular (*Figura R-20, B*).

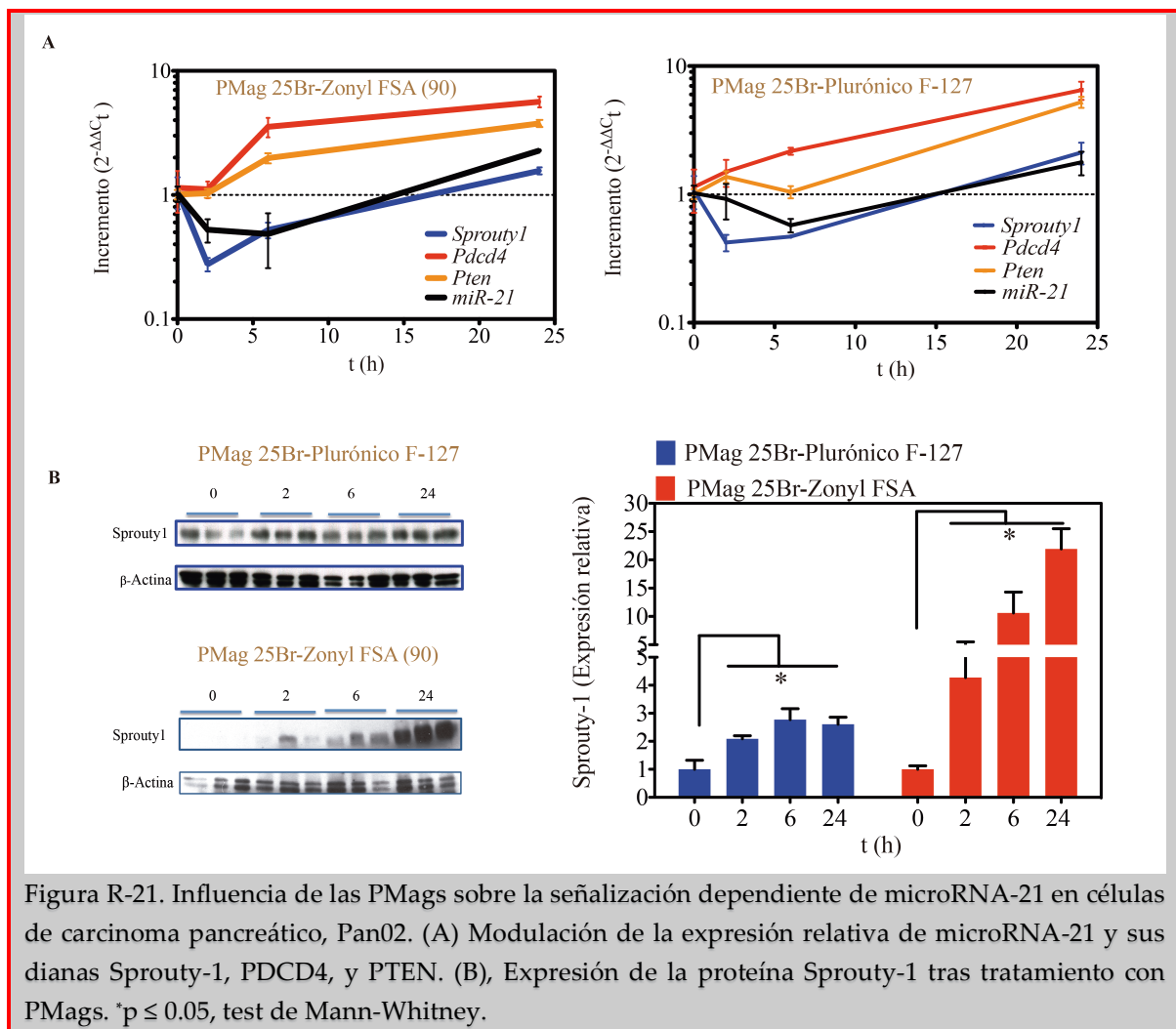


3.3.5. Las PMags modulan la señalización dependiente del oncomiR microARN-21

Dada la influencia del microARN-21 en el desarrollo de células tumorales y su supervivencia, así como en los procesos de invasión, analizamos cómo modulan las PMags la dinámica de expresión de microARN-21 y sus dianas moleculares **PDCD4**³⁰,

³⁰ **PDCD4**: del inglés, *programmed cell death protein-4*

PTEN³¹, y Sprouty-1. El estudio temporal de la expresión de microARN-21 y los transcritos de sus dianas tras el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y PMag 25Br-Plurónico F-127 arrojó que el microARN-21 muestra una cinética similar, con una reducción inicial a las 6 h, seguido por un aumento a las 24 h comparado con los niveles basales (**Figura R-21, A**). Concomitantemente, los transcritos de dos de sus dianas, PDCD4 y PTEN, aumentan a las 6 h, aunque incrementan aún más sus niveles a las 24 h (**Figura R-21, A**).



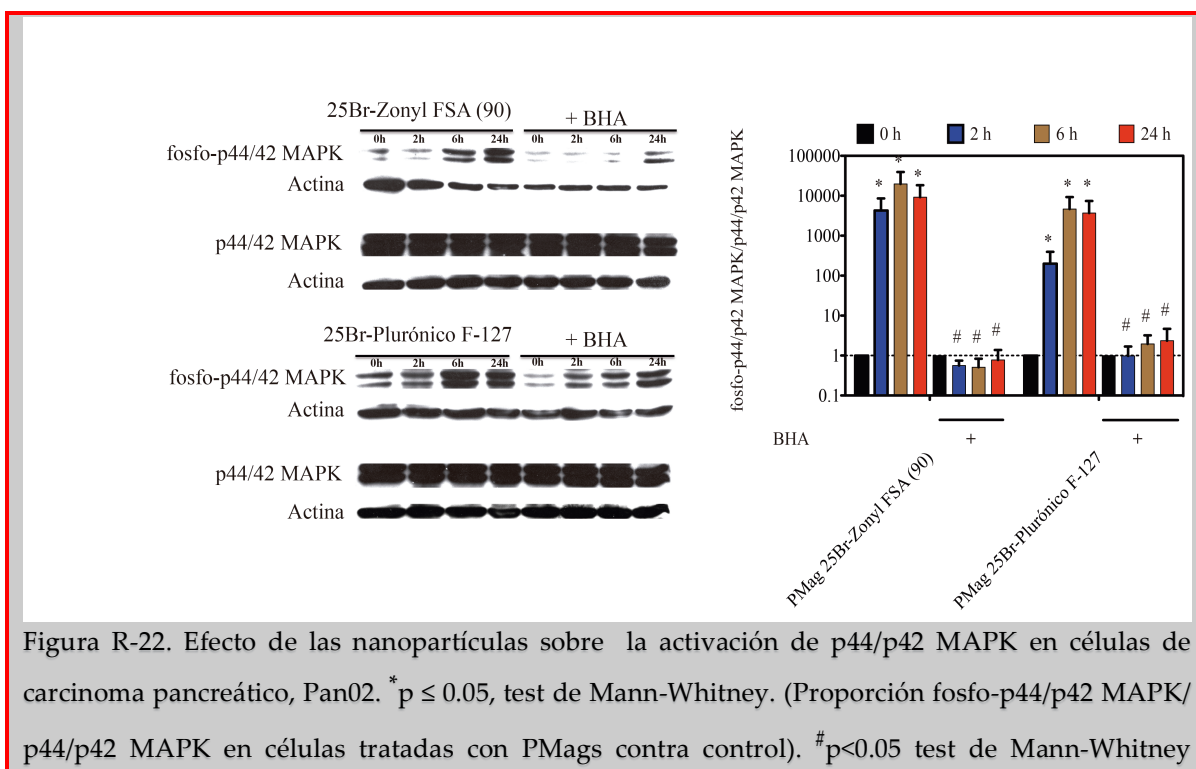
Sin embargo, el patrón de expresión del transcrito de Sprouty-1 se asemejó al del microARN-21. No obstante, los niveles d^e proteína de Sprouty-1 se duplicaron a las 2 h

³¹ **PTEN**: del inglés, *phosphatase and tensin homolog*

tras el tratamiento con PMag 25Br-Plurónico F-127 y aumentaron > 4 veces tras el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (*Figura R-21, B*).

Puesto que microARN-21 es regulado por p44/p42 MAPK³² (Erk1/2³³), analizamos los niveles de fosforilación de Erk1/2 tras el tratamiento con PMags. Tanto PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) como 25Br-Plurónico F-127 aumentaron los niveles de fosforilación de Erk1/2 a los 2 h incrementándose significativamente a las 6 y 24 h (*Figura R-22*).

Para determinar la influencia de producción de EROs por PMags en el incremento de la fosforilación de Erk1/2, pre-tratamos las células Pan02 con el compuesto químico hidroanisole butilado (BHA, del inglés *butylated hydroanisole*) por 2 h. BHA es un compuesto anti-oxidante que reacciona con EROs conllevando a su eliminación. Tal tratamiento provocó una disminución significativa de los niveles de fosforilación en todos los casos, sugiriendo el involucramiento de las EROs en la activación de Erk1/2 (*Figura R-22*).



³² MAPK: del inglés, *mitogen-activated protein kinase*

³³ ERK: del inglés, *extracellular signaling-regulated kinase*

(proporción fosfo-p44/p42 MAPK/ p44/p42 MAPK en células tratadas con PMags y BHA contra solo las tratadas con PMags).

3.3.6. *Las PMags inhiben la degradación de la matriz extracelular*

Puesto que las nanopartículas inhiben la formación de invadosomas, estudiamos el efecto de las mismas en la degradación de la matriz extracelular. Se incubaron (24 h) las células tumorales murinas pancreáticas Pan02 (2×10^4 por pocillo) sobre fragmento de membrana basal intestinal de ratones, se fijaron, permeabilizaron y el colágeno IV se marcó con un anticuerpo específico. Se cuantificó el área libre de colágeno (área degradada) a partir de imágenes proyectadas y se calculó el área degradada por célula. Como se puede observar, las células de carcinoma murino Pan02 tienen una alta capacidad degradativa del colágeno IV llegando a degradar un promedio de $750 \mu\text{m}^2$ / célula (*Figura R-23, A y B*). Sin embargo, cuando son tratadas tanto con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) o 25Br-Plurónico F-127, las células Pan02 degradan significativamente menos matriz extracelular (*Figura R-23, A y B*), cayendo a un promedio de 170 y $190 \mu\text{m}^2$ de área degradada por célula, respectivamente.

En concordancia, los niveles de colágeno tipo IV internalizados por las células tratadas con nanopartículas disminuyeron comparada al control de células sin tratamiento (*Figura R-24*).

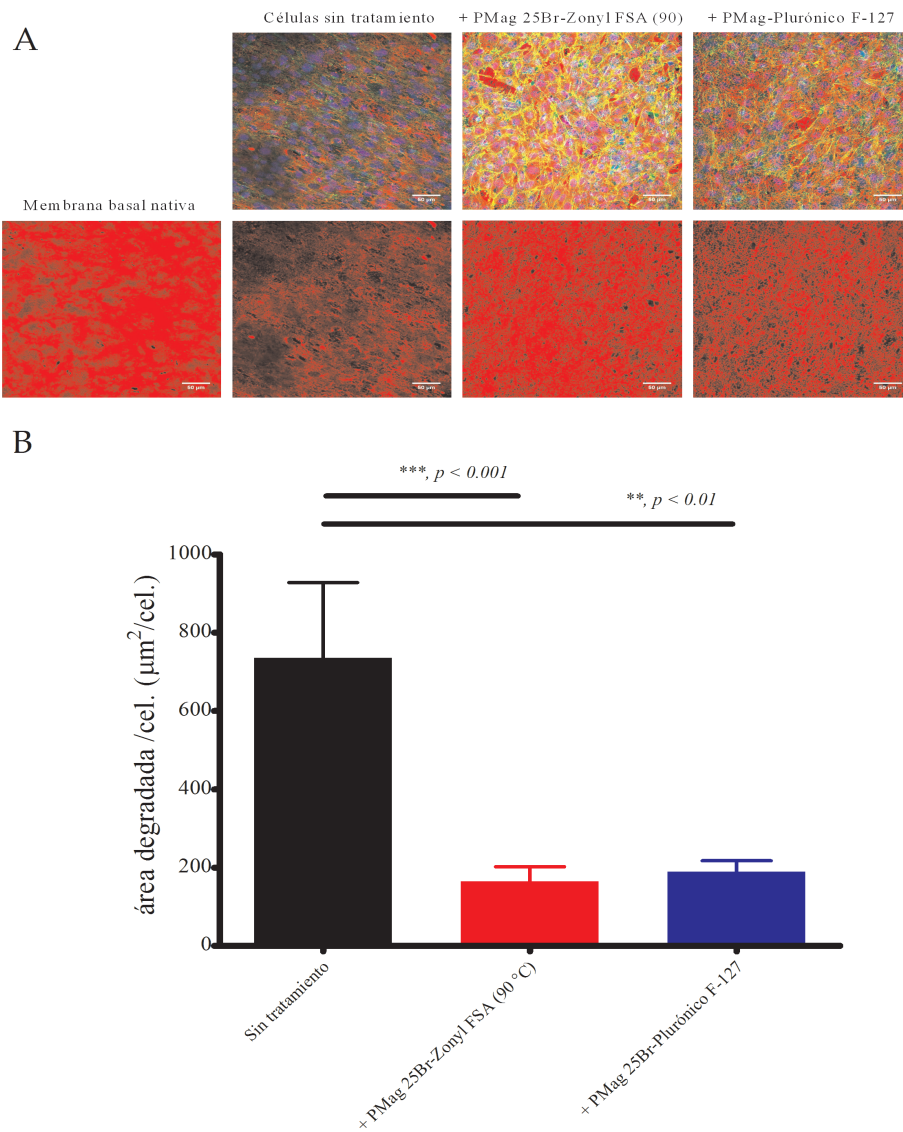
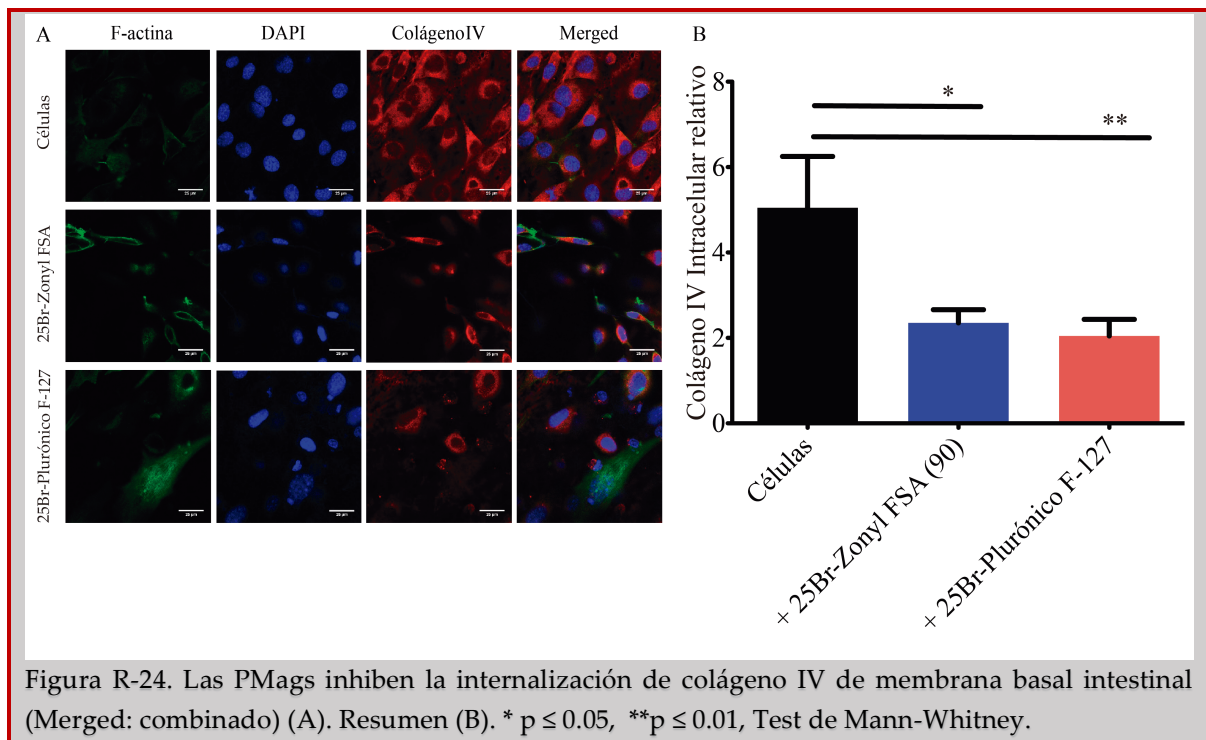


Figura R-23. Las PMags inhiben la degradación de colágeno IV de membrana basal intestinal (A). Resumen (B). Verde: actina filamentosa; rojo: colágeno IV; Azul: núcleo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Test de Mann-Whitney.



Como consecuencia, las células de adenocarcinoma pancreático murino, Pan02, parecen penetrar menos a través de las dos capas de colágeno que conforman la estructura de la membrana basal comparado con las células sin tratamiento que, incluso, son capaces de atravesar completamente la membrana (*Figura R-25*).

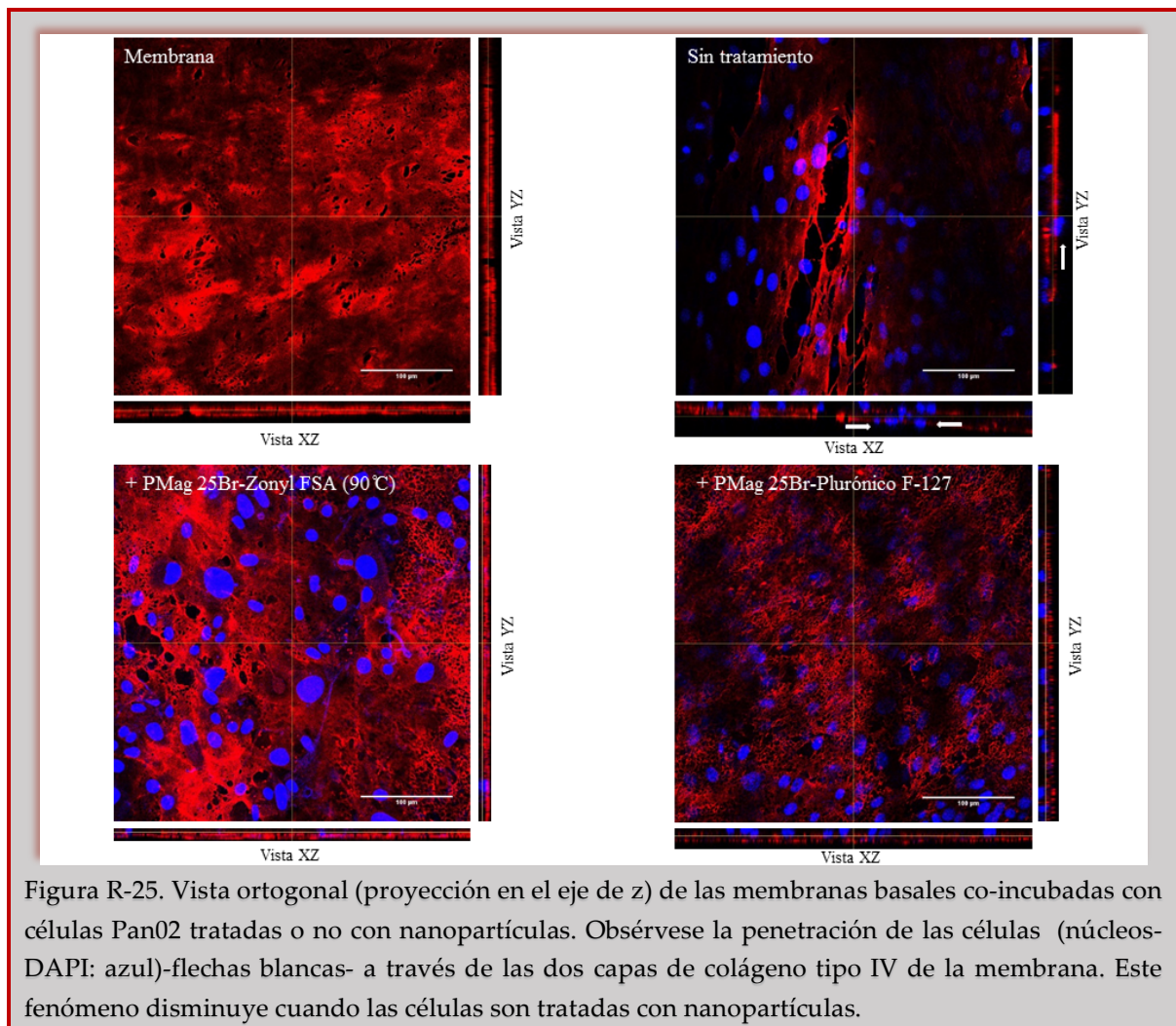


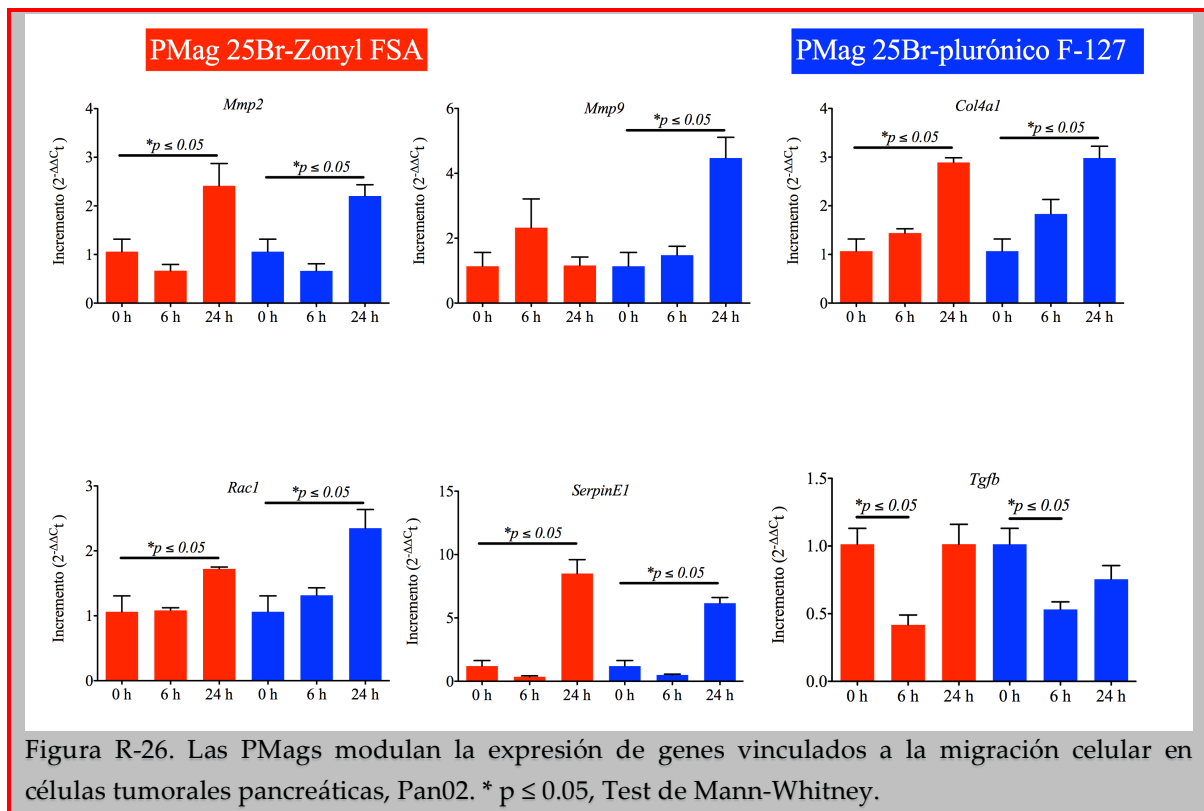
Figura R-25. Vista ortogonal (proyección en el eje de z) de las membranas basales co-incubadas con células Pan02 tratadas o no con nanopartículas. Obsérvese la penetración de las células (núcleos-DAPI: azul)-flechas blancas- a través de las dos capas de colágeno tipo IV de la membrana. Este fenómeno disminuye cuando las células son tratadas con nanopartículas.

3.3.7. Las PMags afectan la expresión de genes vinculados a la migración/invasión

Analizamos la expresión de varios genes vinculados con la migración celular. Aunque, las PMags inducen la sobre-expresión de factores involucrados positivamente en la degradación y migración celular como *Mmp2*, *Mmp9*³⁴, *Col4a1* y *Rac1* a las 24 h, el inhibidor de la migración *SerpinE1*, un inhibidor natural del activador tisular de plasminógeno (tPA) y uroquinasa (uPA), aumenta concomitantemente con una disminución en los niveles de uno de los mayores factores pro-metastásicos, *Tgfb*³⁵, 6 h tras el tratamiento con nanopartículas (Figura R-26).

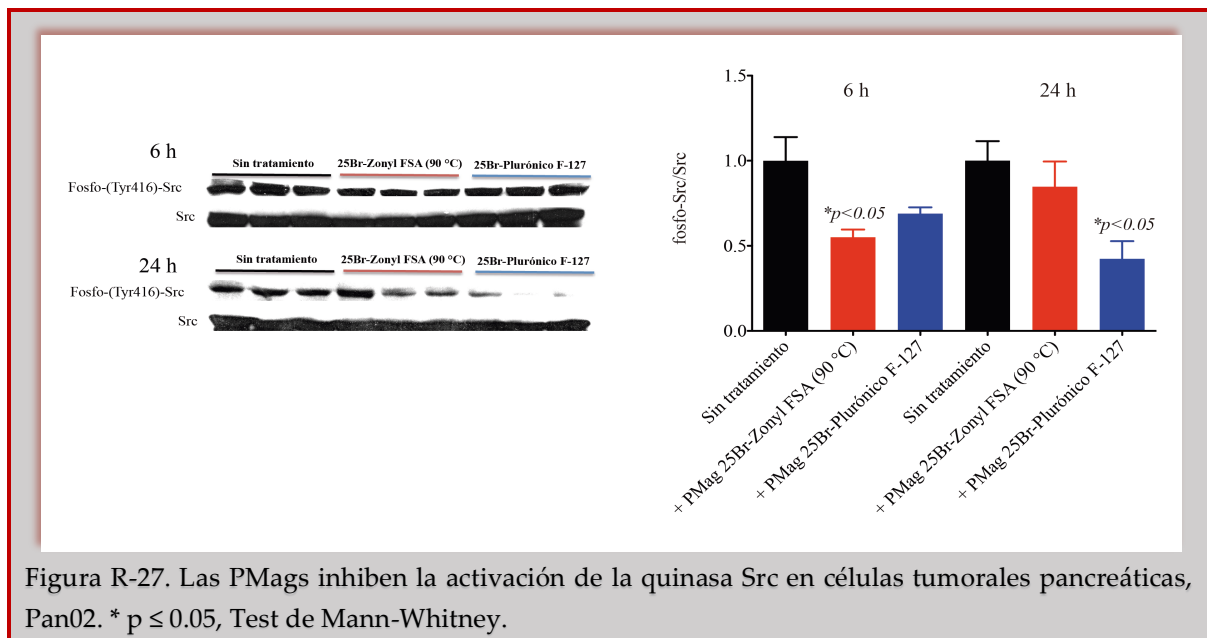
³⁴ **MMP**: del inglés, *metalloproteinase*

³⁵ **TGFβ**: del inglés, *tumor growth factor-β*

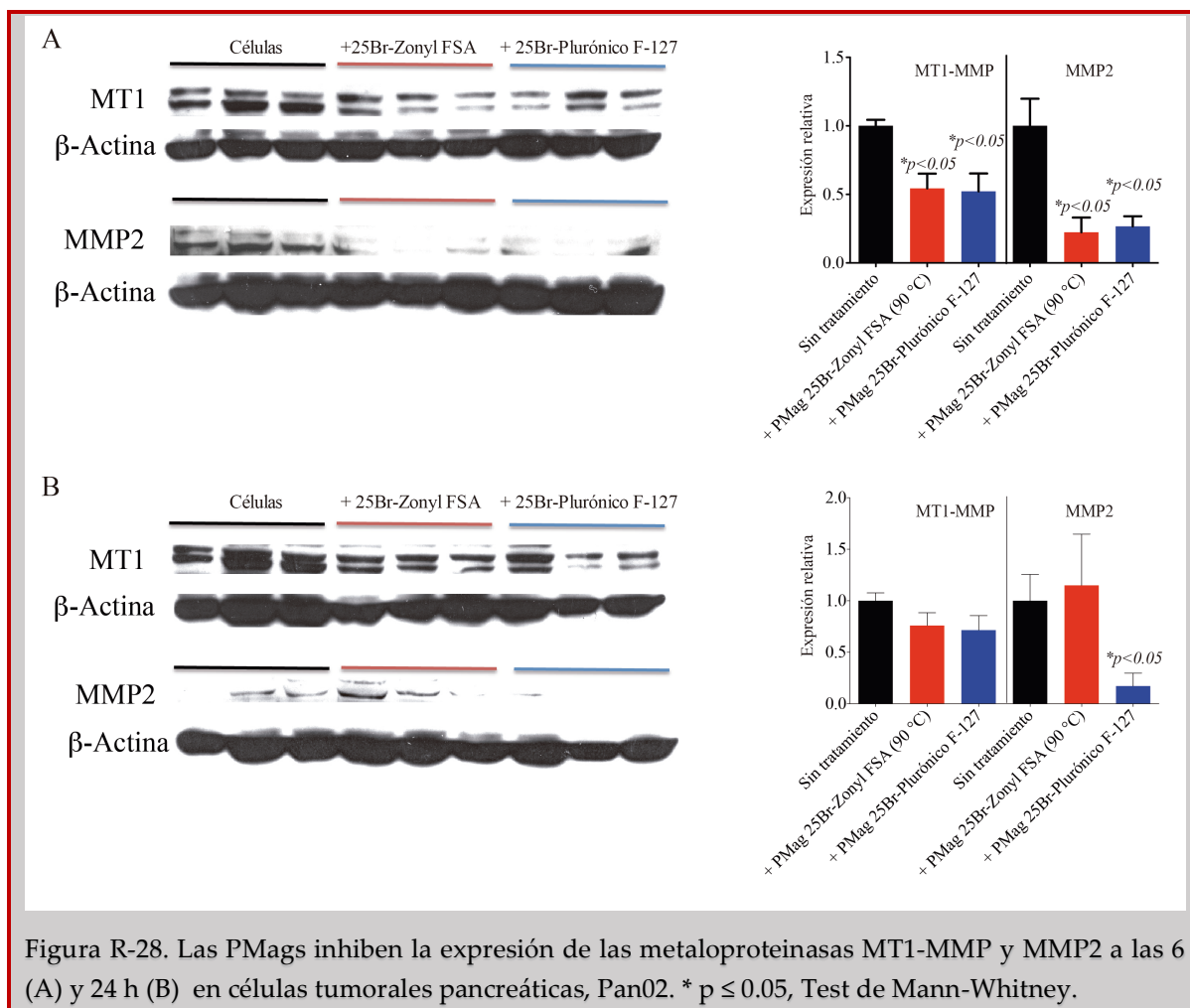


3.3.8. Las PMags inhiben la activación de la quinasa Src y la expresión de las metaloproteinasas MT1-MMP y MMP2

La formación de invadosomas está regulada por la quinasa Src [172]. Como observamos una reducción de la formación de estas estructuras estudiamos cómo afectan las PMags la activación de la quinasa Src. El tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 inhibió la fosforilación de Src a las 6 y 24 h de tratamiento (Figura R-27). Esta inhibición fue significativa a las 6 h con el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), y a las 24 h con el tratamiento con PMag y 25Br-Plurónico F-12, sugiriendo una cinética defecto diferente.



Para dilucidar el mecanismo por el cual las células Pan02 tratadas con PMags degradan menos la matriz extracelular, determinamos la expresión de dos metaloproteinasas importantes en este proceso, MT1-MMP y MMP2. Observamos una reducción significativa de la expresión de las enzimas a las 6 h de tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 (*Figura R-28A*). En tanto, solo detectamos niveles reducidos de MMP2 a las 24 h con el tratamiento con PMag 25Br-Plurónico F-127 (*Figura R-28B*). Por lo tanto, la inhibición de la activación de la quinasa Src y la disminución de la expresión de las metaloproteinasas MT1-MMP y MMP2 podrían ser la causa de la disminución tanto de la densidad de invadosomas como de la degradación de la matriz extracelular.



3.3.9. Las PMags modulan la expresión de genes respondedores a NF- κ B

Uno de los factores de transcripción activados por Erk1/2 es el NF- κ B (del inglés *Nuclear Factor- κ B*), responsable de la activación de varios genes involucrados en la proliferación, angiogénesis, respuesta inmune, etc. Para dilucidar si la ruta de señalización dependiente de NF- κ B se activa tras el tratamiento con PMag, analizamos los niveles de expresión de varios genes asociados a este factor de transcripción.

Cuando las células Pan02 se trataron con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) observamos un incremento significativo de los transcritos de *Cxcl3*, 5, y 7 a las 24 h, factores con propiedades angiogénicas (Figura R-29, izquierda). Por el contrario, los transcritos de *Cxcl10* y *Cxcl11* disminuyeron a las 6 h, aunque sus niveles se recuperaron a las 24 h.

Sin embargo, cuando las células Pan02 fueron tratadas con PMag 25Br-Plurónico F-127, no solo los transcritos de los factores angiogénicos *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, y *Cxcl7* aumentaron a las 24 h, sino también, los de las quimioquinas angiostáticas *Cxcl10* y *Cxcl11* (*Figura R-29, derecha*).

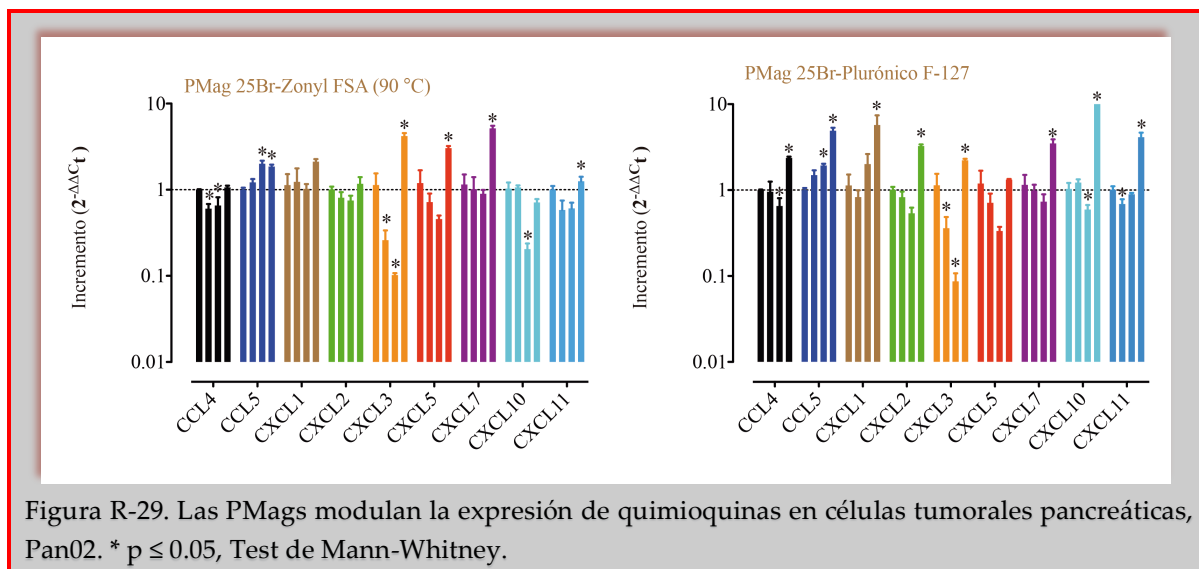
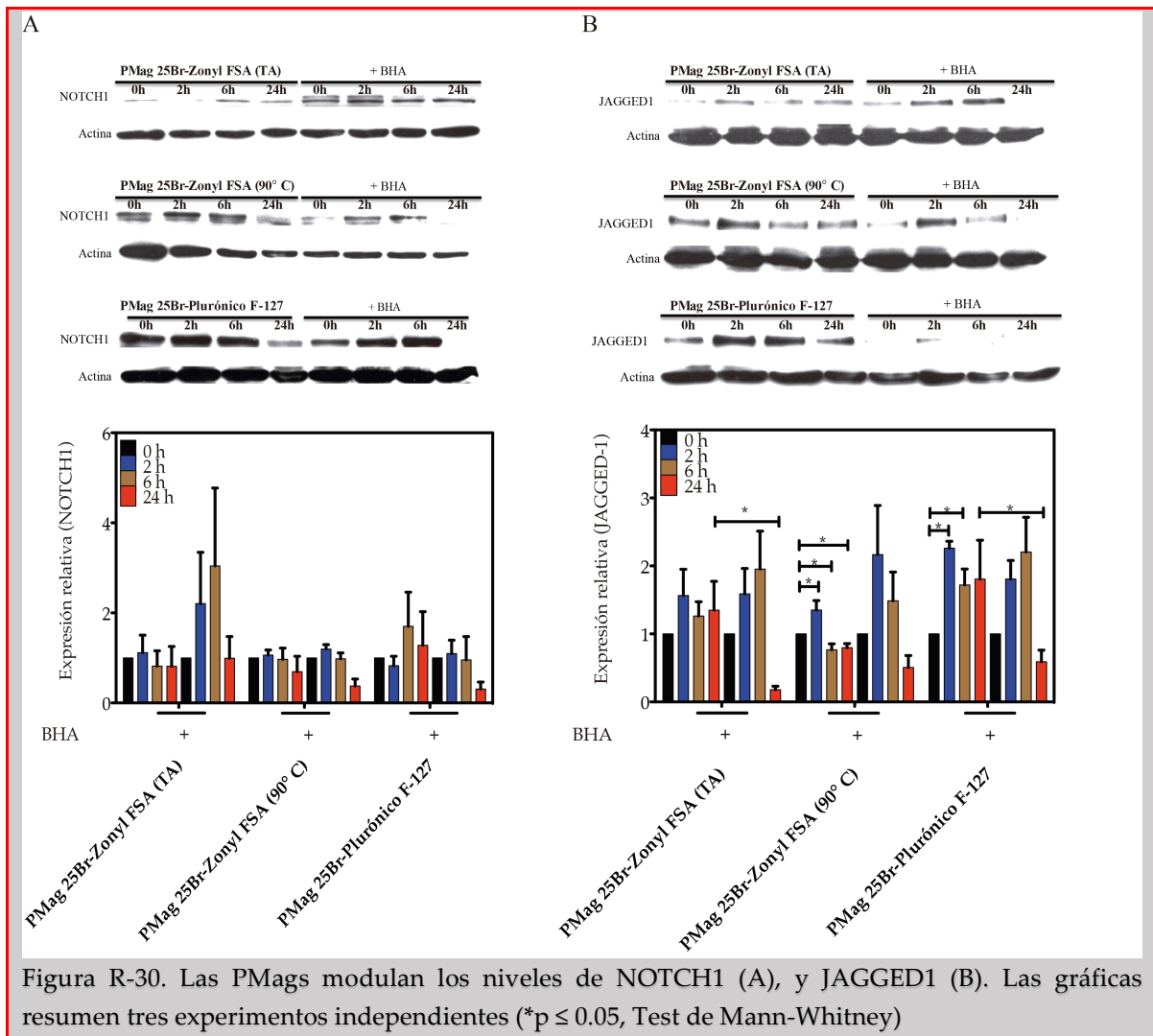


Figura R-29. Las PMags modulan la expresión de quimioquinas en células tumorales pancreáticas, Pan02. * $p \leq 0.05$, Test de Mann-Whitney.

3.3.10. Las PMags regulan la señalización a través de NOTCH-1

Una de las rutas de señalización con más impacto en el desarrollo de tumores es la dependiente de NOTCH1, especialmente en procesos proliferativos [173], y de migración celular [174]. Aunque PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 no modularon significativamente los niveles de NOTCH1, todas, excepto PMag25Br-Zonyl FSA (TA), sí indujeron un aumento significativo a las 2 h de Jagged1, un ligando natural de NOTCH1 (*Figura R-30*). Aunque el pre-tratamiento con BHA no afectó la inducción temprana de Jagged1, sí afectó la expresión del ligandoo a las 24 h tras tratamiento con PMag, provocando su disminución. Por lo tanto, el tratamiento con PMags podría activar la señalización por Notch1, pero no influye en la proliferación de las células tumorales pancreáticas.



3.4. Bioactividad intrínseca en células endoteliales (SVEC4-10) y fibroblásticas (NIH3T3)

Uno de los sistemas celulares con los que las nanopartículas interactúan en su recorrido sistémico, está compuesto por las células endoteliales. Por ello, decidimos estudiar el efecto que tienen las PMags en estas células. Para ello, tomamos como modelo celular la línea de células murinas del endotelio vascular transformadas con SV40, SVEC4-10. Estas células muestran las características típicas del endotelio posibilitando su uso como modelo. Una de estas características es la alta capacidad de migración que permite la formación rápida de capas celulares y nuevos vasos sanguíneos.

Primero, determinamos cómo afecta el tratamiento con PMags el perfil de expresión génica vinculado a la angiogénesis y respuesta inmune. Como se observa, todas las PMags, excepto PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), indujeron el aumento de expresión de genes vinculados a la respuesta inmune tipo T_H1 como *Tnfa*³⁶, *Il6*, *Ccl1* y *Ccl2*, en tanto, factores inmunosupresores como TGFβ disminuyeron (*Figura R-31*). Por otra parte, quimioquinas pro-angiogénicas como *Cxcl1*, -2, y -3 aumentan significativamente su expresión génica, aunque su receptor *Cxcr2* no sufre un cambio significativo (*Figura R-31*).

Para determinar el efecto de las nanopartículas sobre la capacidad invasiva/migración de las células endoteliales, las células SVEC4-10 se dejaron crecer hasta confluencia, se cambió el medio de cultivo por medio completo DMEM que contenía PMag a 6.25 µg/ml. Se quitaron los moldes de silicona (que permiten dejar una abertura en medio de la capa celular) con los que habíamos cultivado las células, y se dejaron a 37 °C y 5 % CO₂. Se tomaron fotos en campo claro cada 30 minutos de áreas constantes durante 18 h.

³⁶ **TNFα**: del inglés, *tumor necrosis factor-α*

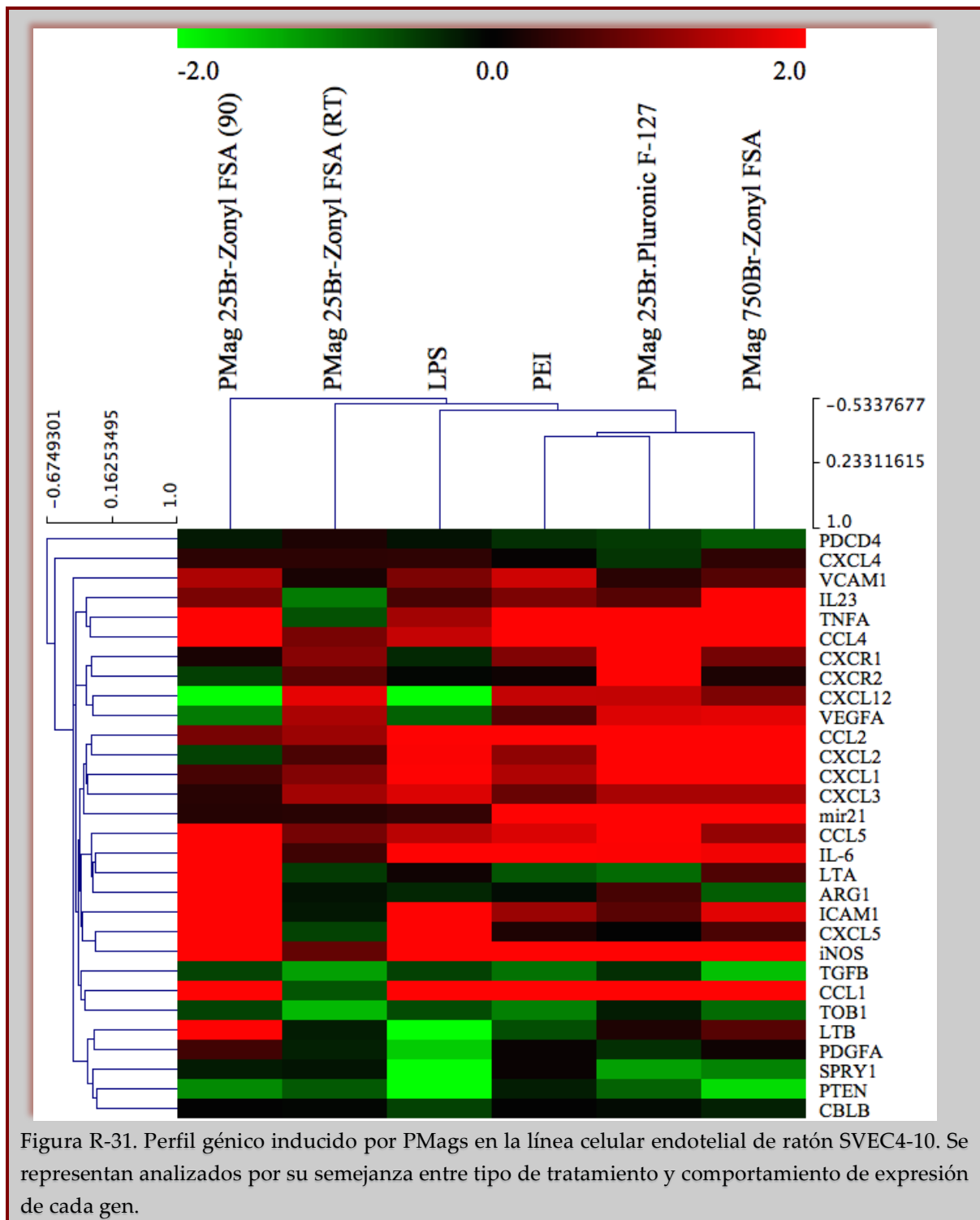
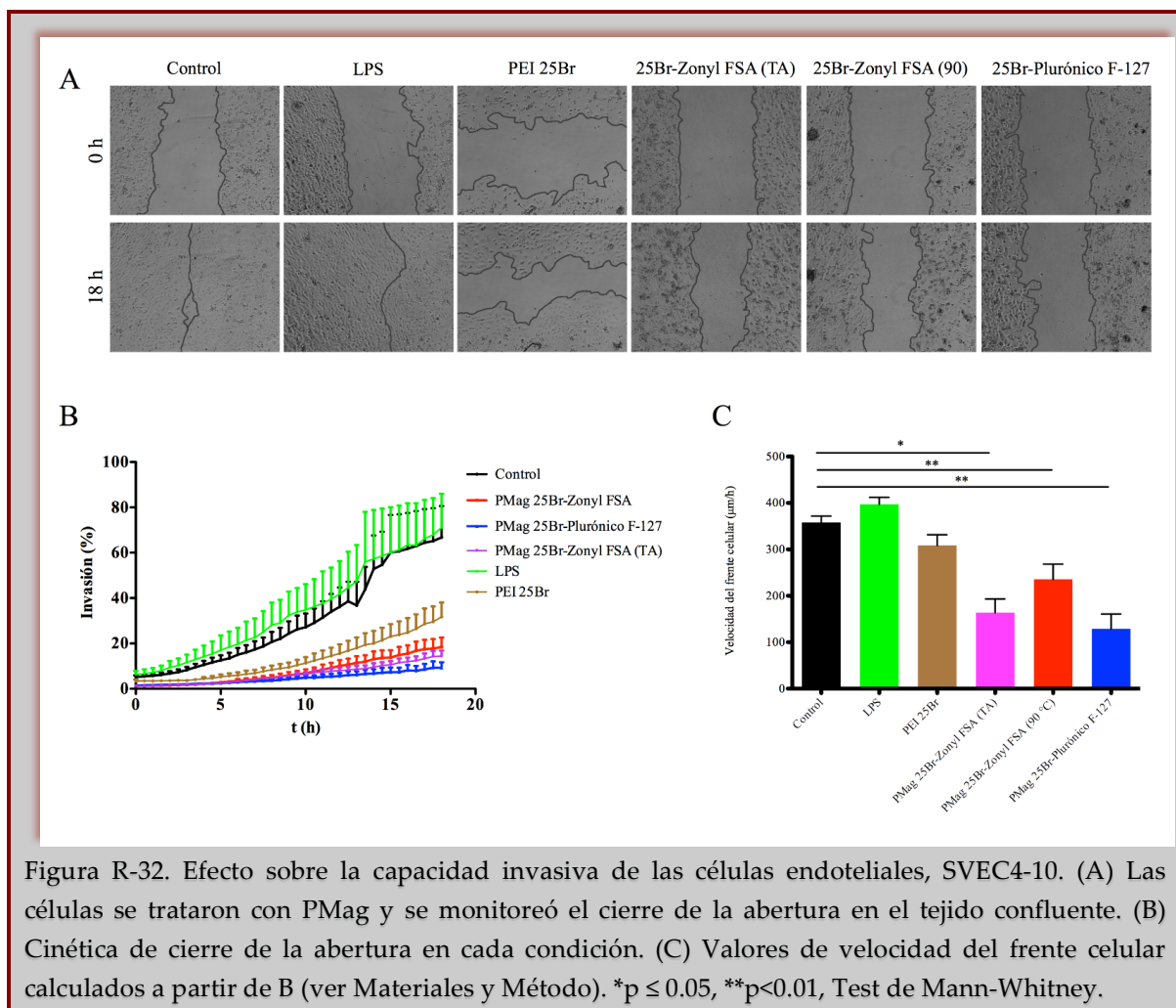


Figura R-31. Perfil génico inducido por PMags en la línea celular endotelial de ratón SVEC4-10. Se representan analizados por su semejanza entre tipo de tratamiento y comportamiento de expresión de cada gen.

El tratamiento con LPS³⁷ (1 µg/ml) aumentó levemente la velocidad del frente celular con mayor grado de confluencia a las 18 h comparado a las células sin tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), 25Br-Zonyl FSA (TA), y 25Br-Plurónico F-127 redujo significativamente la capacidad de invasión de las células (*Figura R-32, A y B*). En concordancia, la velocidad del frente celular disminuyó significativamente, comparada con las células sin tratamiento (*Figura R-32, C*).



El análisis del movimiento de células individuales arrojó un retardo significativo con la consecuente disminución de las distancias recorridas por las células (*Figura R-33, A y C*). Este retardo no influyó en la direccionalidad del movimiento (*Figura R-33, B*).

³⁷ LPS: lipopolisacáido

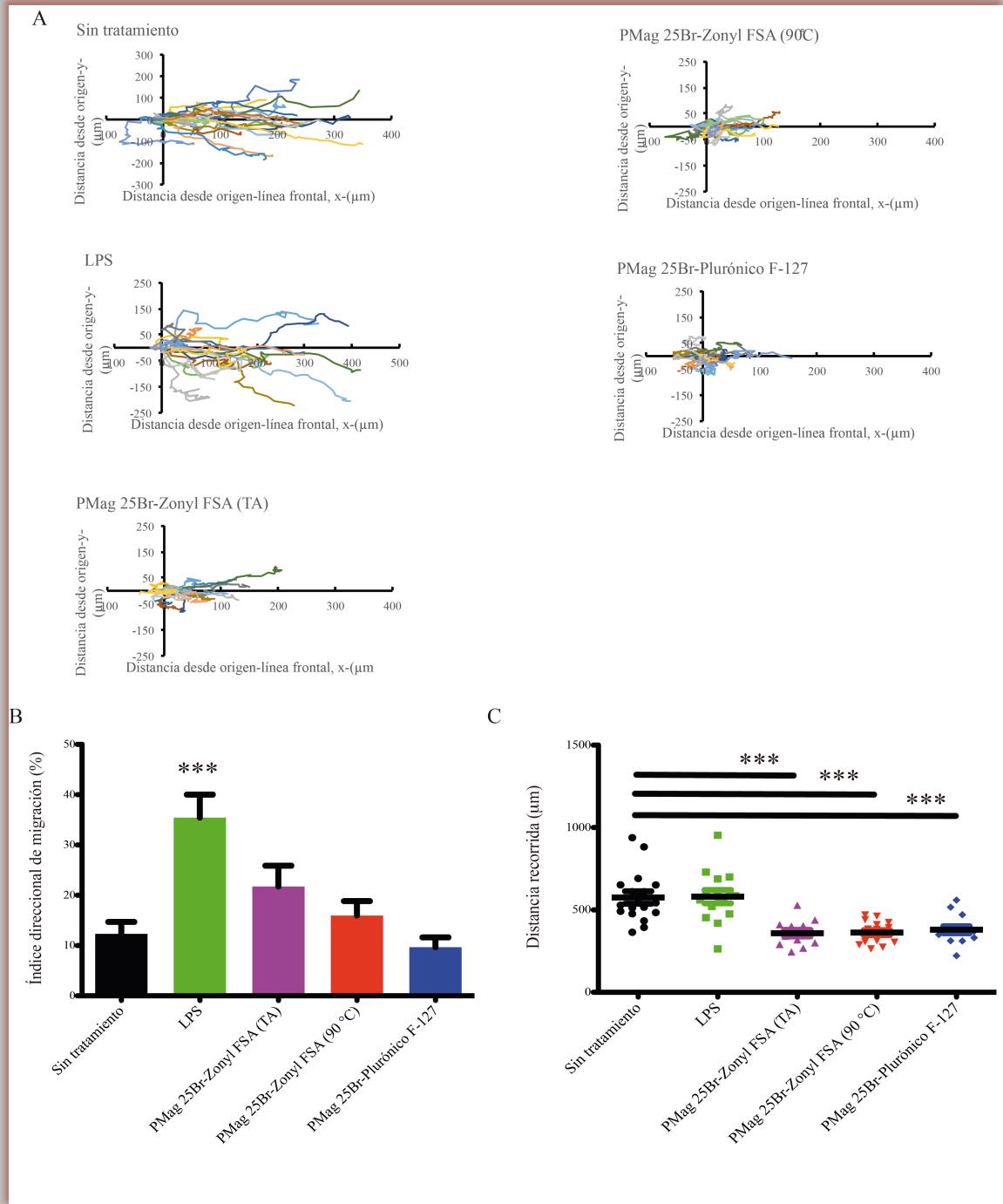
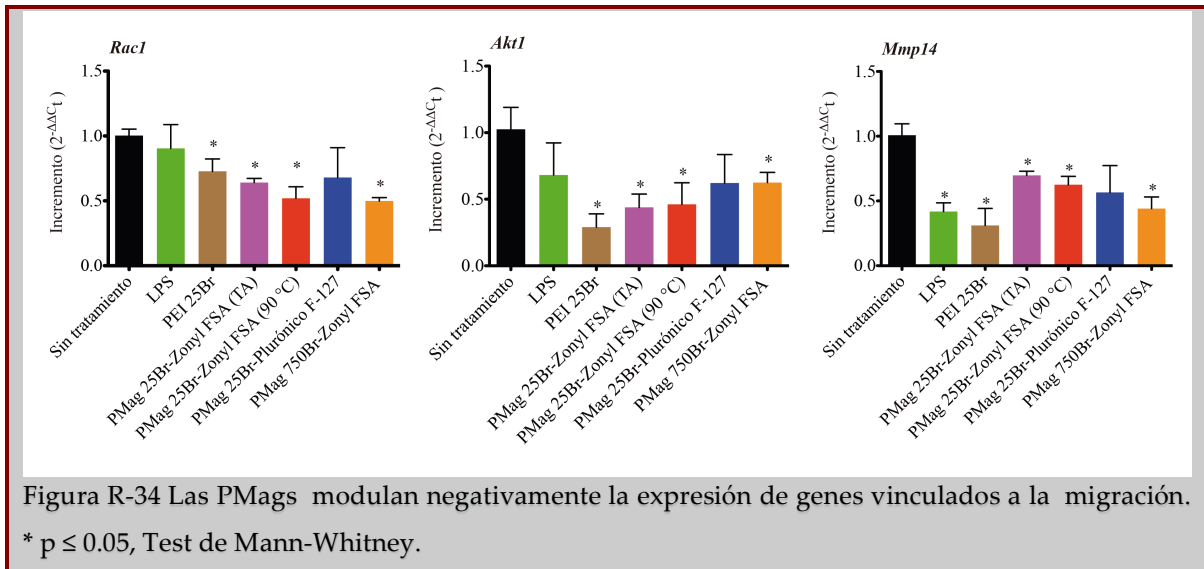


Figura R-33. Las PMags inhiben la invasión de células endoteliales murinas, SVEC4-10. (A) Migración de células individuales con o sin tratamiento. (B) índice de direccionalidad de las células con o sin tratamiento. (C) Distancia recorrida por células individuales. *** $p \leq 0.001$, Test de Mann-Whitney.

A continuación, determinamos la expresión de tres genes vinculados a los procesos migratorios celulares. El tratamiento con las PMags, excepto 25Br-Plurónico F-127, indujo la disminución de la expresión de *Rac1*, *Akt1*, y *Mmp14* (**Figura R-34**). En el caso del tratamiento con PMag 25Br-Plurónico F-127 se observó una tendencia en la disminución de la expresión de estos tres genes.



Otro tipo celular con el que las nanopartículas interactúan en su recorrido sistémico, son los fibroblastos. Estos participan activamente en la respuesta inmune innata. Por ello, determinamos la afectación de la expresión de varios genes vinculados a la respuesta inmune en fibroblastos murinos (NIH 3T3). Como se observa, el tratamiento con PMag afectó la expresión de las quimioquinas *Cxcl1* (disminución), *Cxcl2* (aumenta con el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y -750Br-Zonyl FSA), *Cxcl5* (disminuye en todos los casos), *Ccl4* (aumenta excepto con el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA)) y *Ccl5* (disminuye con el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), pero disminuye con el tratamiento con PMag 25Br-Plurónico F-127) (**Figura R-35**)

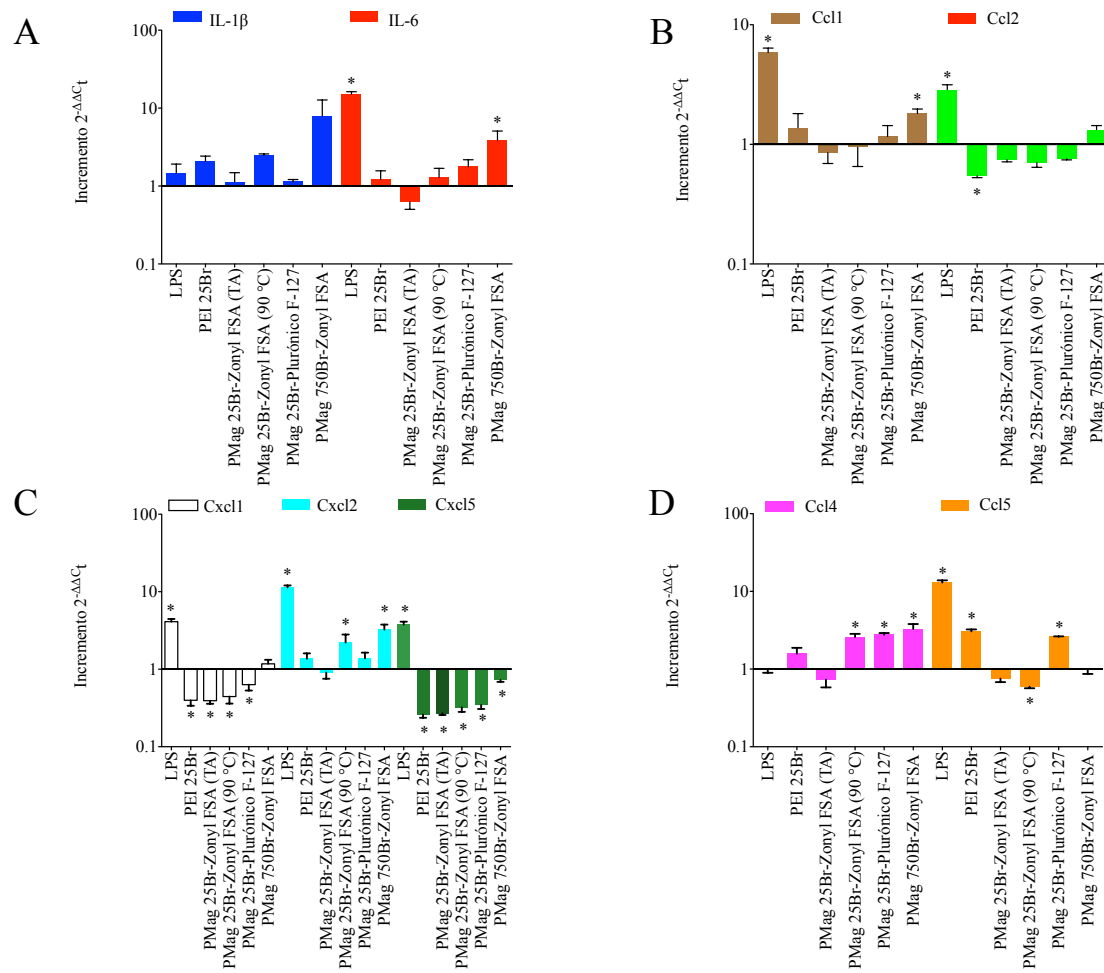


Figura R-35. Las PMags modulan diferentes genes vinculados a la respuesta inmune en fibroblastos murinos, NIH 3T3. * $p \leq 0.05$, Test de Mann-Whitney.

3.5. Bioactividad intrínseca en células del sistema fagocítico mononuclear (SFM)

3.5.1. Las PMags inducen la secreción de IL-12 p70 e IL-10 por macrófagos

Para determinar cómo las PMags afectan a los macrófagos, incubamos células de la línea celular humana pro-monocítica THP1 (diferenciada con PMA por >72 h) con PMags a concentraciones crecientes durante 6 h. Las nanopartículas indujeron la secreción de IL-12 p70, independientemente de si se sintetizaron con el surfactante Zonyl FSA o Plurónico F-127 (Figura R-33, A).

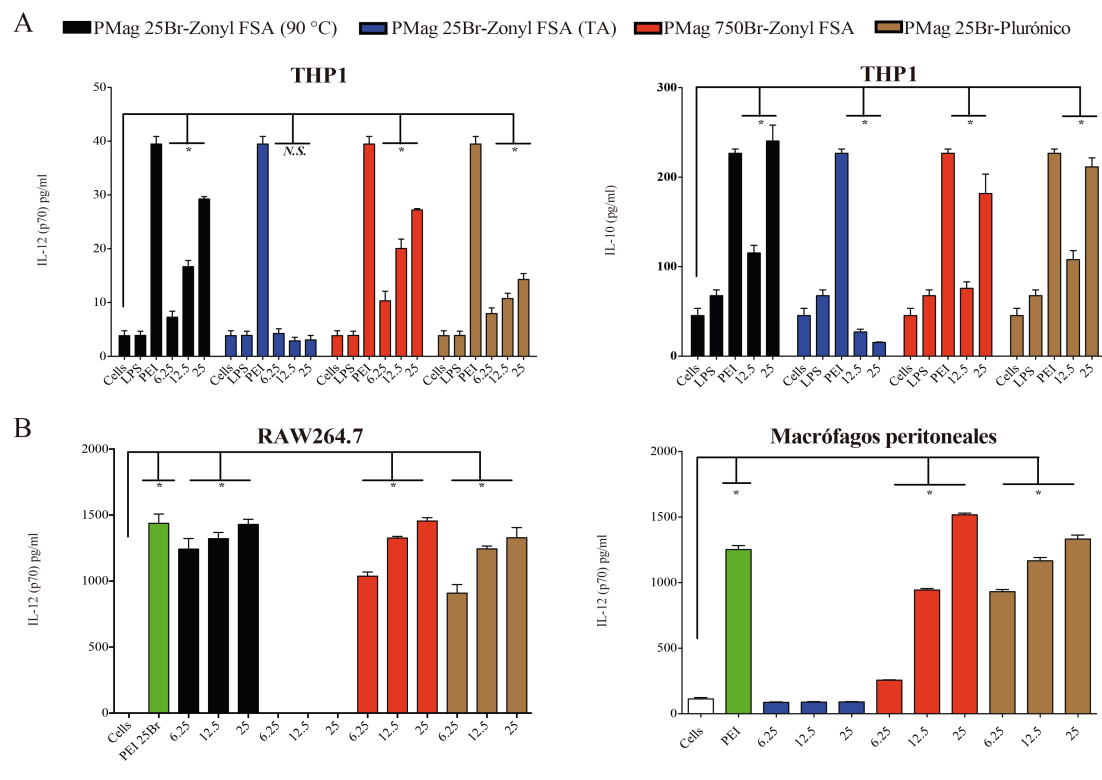
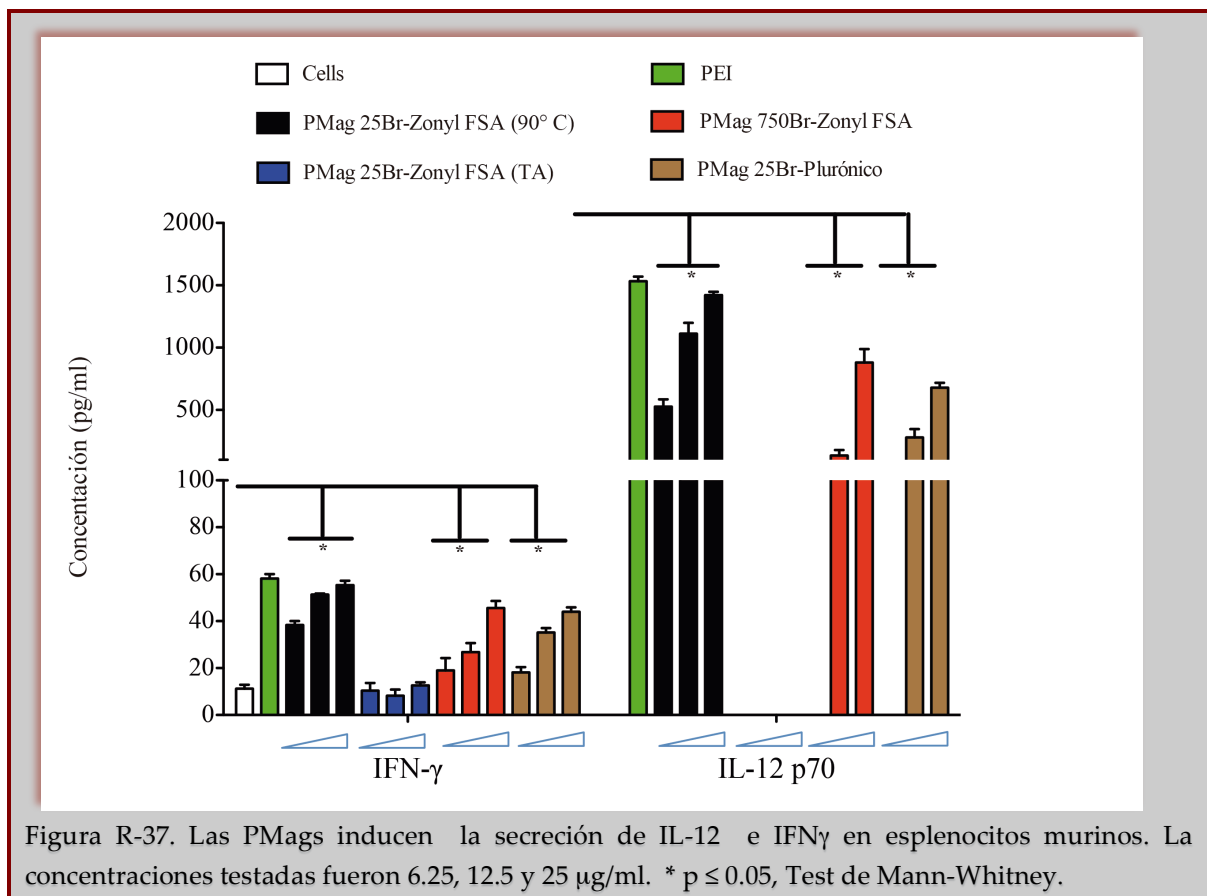


Figura R-36. Las PMags inducen (A) la secreción de IL-12 e IL-10 en las células promonocíticas humanas, THP1; (B) de IL-12 en macrófagos murinos RAW264.7 y macrófagos peritoneales. * $p \leq 0.05$, Test de Mann-Whitney.

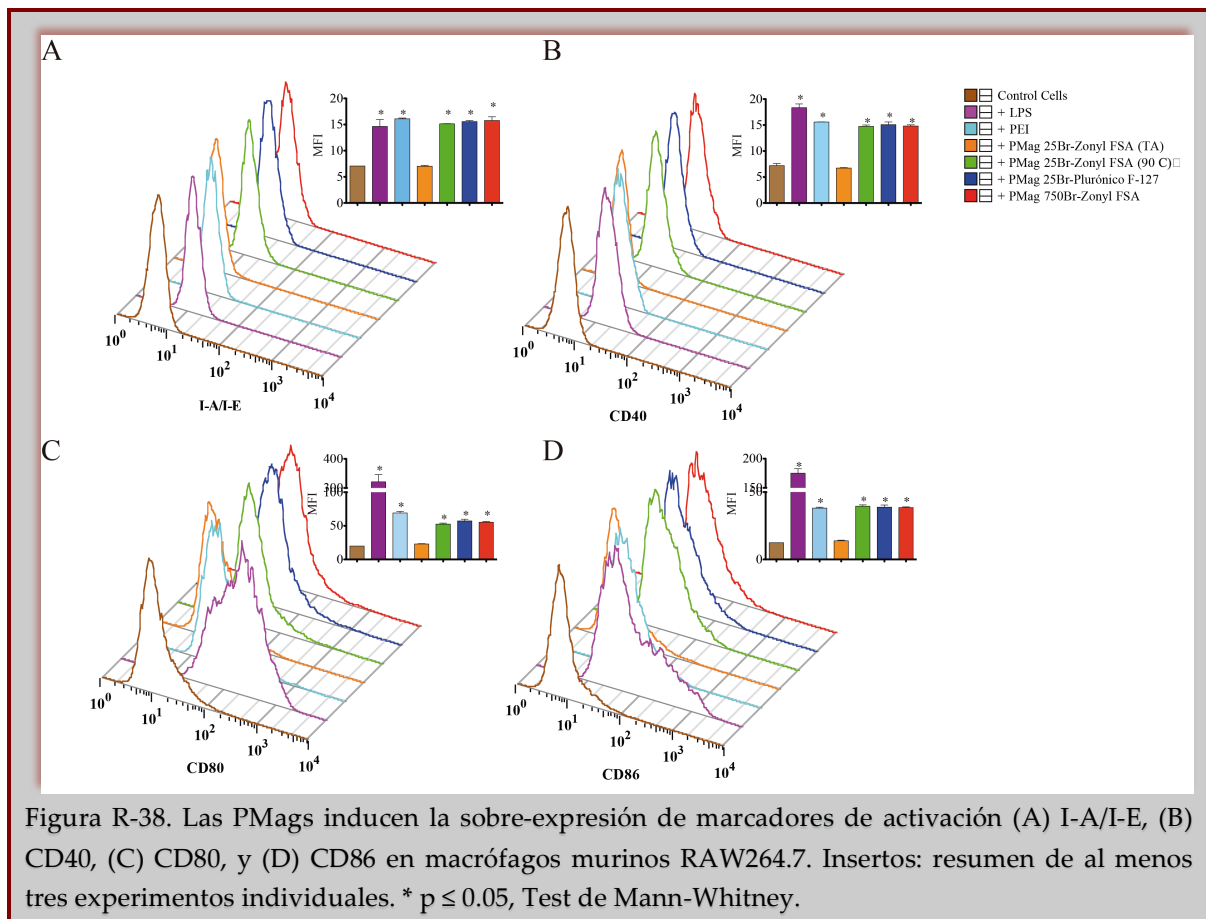
PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no indujo la secreción de IL-12 p70, aunque tiene composición similar a PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (Figura R-36, A). Sin embargo, es de destacar que PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) tienen menor contenido orgánico (10 %) que PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (51 %). Las nanopartículas recubiertas con PEI de 750 kDa y Zonyl FSA mostraron una capacidad similar de estimulación de la secreción de IL-12 p70 por células THP1 diferenciadas. Todas las nanopartículas analizadas, excepto PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), indujeron igualmente la secreción de IL-10. Notablemente, PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) inhibió la secreción de IL-10 (Figura R-36, A).

Igualmente, PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C), 25Br-Plurónico F-127, y 750Br-Zonyl FSA indujeron la secreción de IL-12 p70 por parte de la línea celular murina similar a

macrófagos, RAW264.7 (*Figura R-36, B*). Para validar estos resultados en un modelo *ex vivo*, aislamos macrófagos peritoneales y esplenocitos de ratones C57BL/6, y los cultivamos con PMags en similares condiciones que anteriormente. Todas las PMags excepto PMag 25Br-Zonyl FSA (TA), indujeron la secreción de IL-12 p70 por macrófagos peritoneales (*Figura R-36, B*) y esplenocitos (*Figura R-37*), como también IFN- γ por estos últimos (*Figura R-37*).

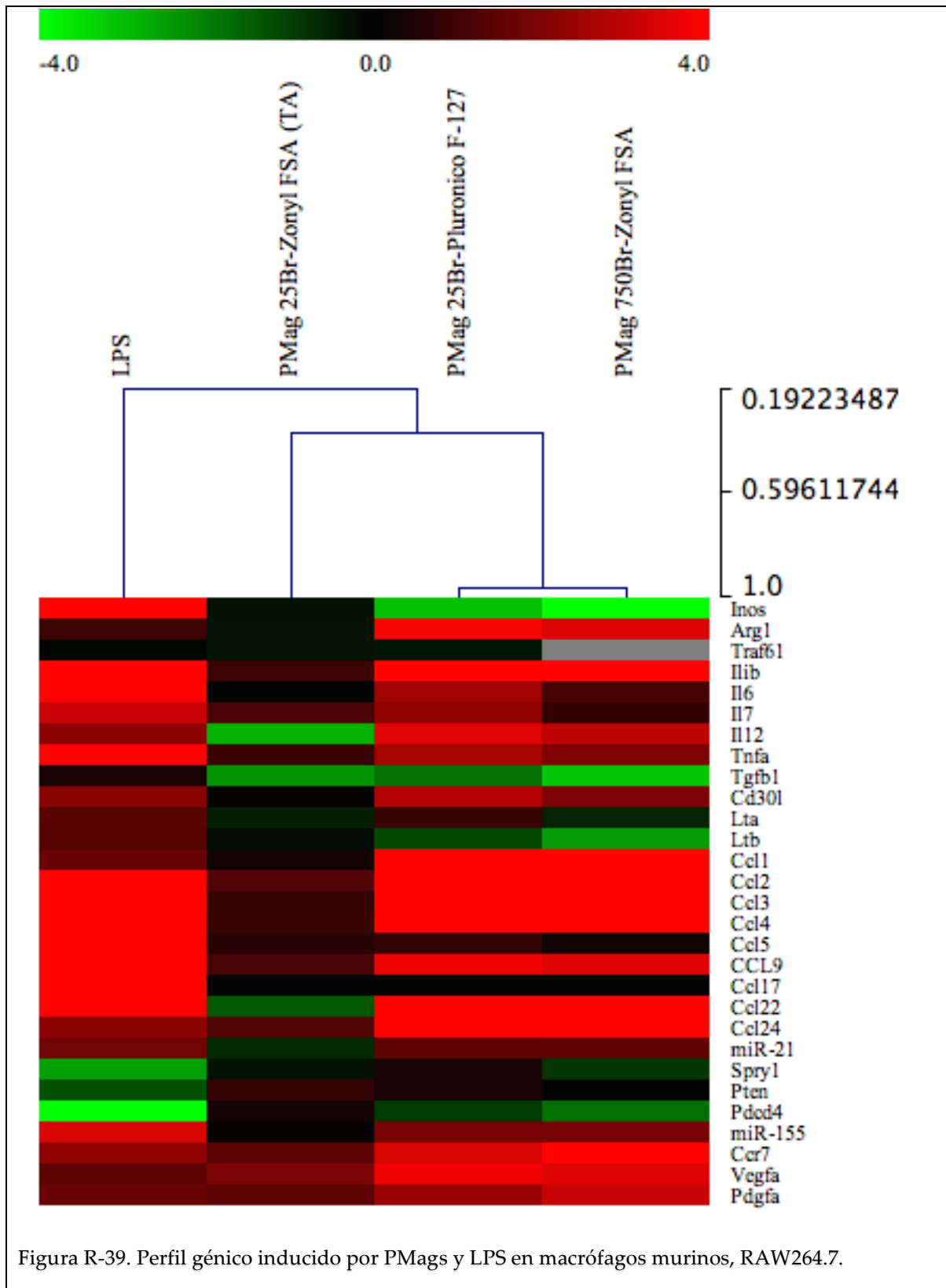


Para confirmar el estatus activado de los macrófagos, evaluamos la expresión de marcadores *bona fide* de activación. Las células RAW264.7 tratadas con PMags sobreexpresaron CD40, I-A/I-E, CD80 y CD86 (*Figura R-38*), excepto con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA).

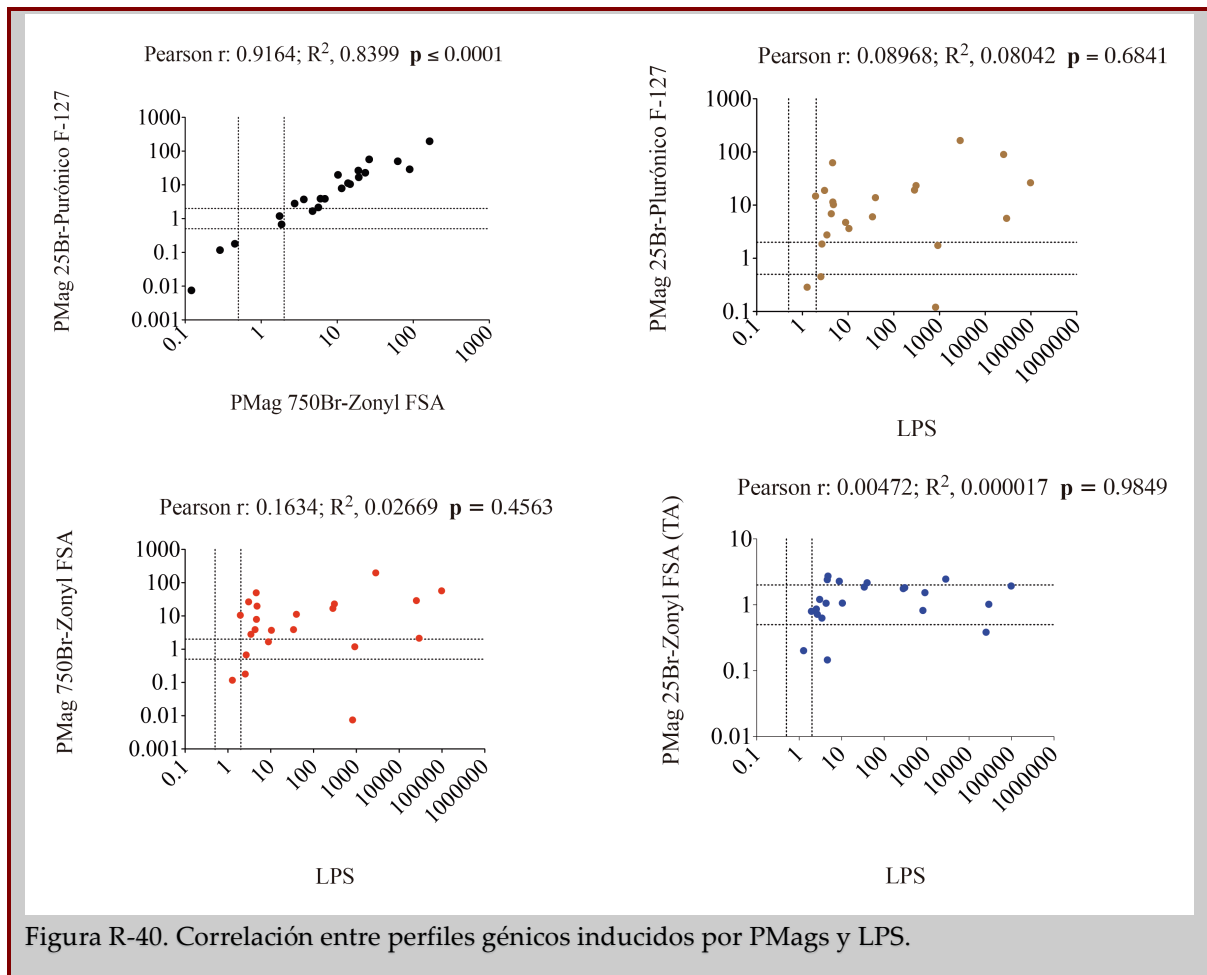


3.5.2. Las PMags inducen un perfil de expresión génica de activación en macrófagos RAW264.7 pero difieren del inducido por LPS

Las células RAW264.7 tratadas con PMag 25Br-Plurónico F-127 y 750Br-Zonyl FSA a 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (la menor concentración a la que observamos secreción de IL-12 p70) durante 6 h, mostraron un perfil de expresión de genes asociados a la activación de macrófagos (Figura R-39).



Los niveles de expresión de los transcritos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12 aumentaron tras exposición a PMag 25Br-Plurónico F-127 y 750Br-Zonyl FSA. CCL1, CCL2, CCL3 y CCL4 aumentaron sus niveles de expresión génica >10 veces. Los niveles de transcritos de otras quimocinas involucradas en la respuesta tipo Th1, CCL22 y CCL24, también aumentaron tras tratamiento de las células RAW264.7 con PMag 25Br-Plurónico F-127 y 750Br-Zonyl FSA. Sin embargo, el tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no indujo la expresión de genes asociados con la activación de macrófagos (Figura R-39).

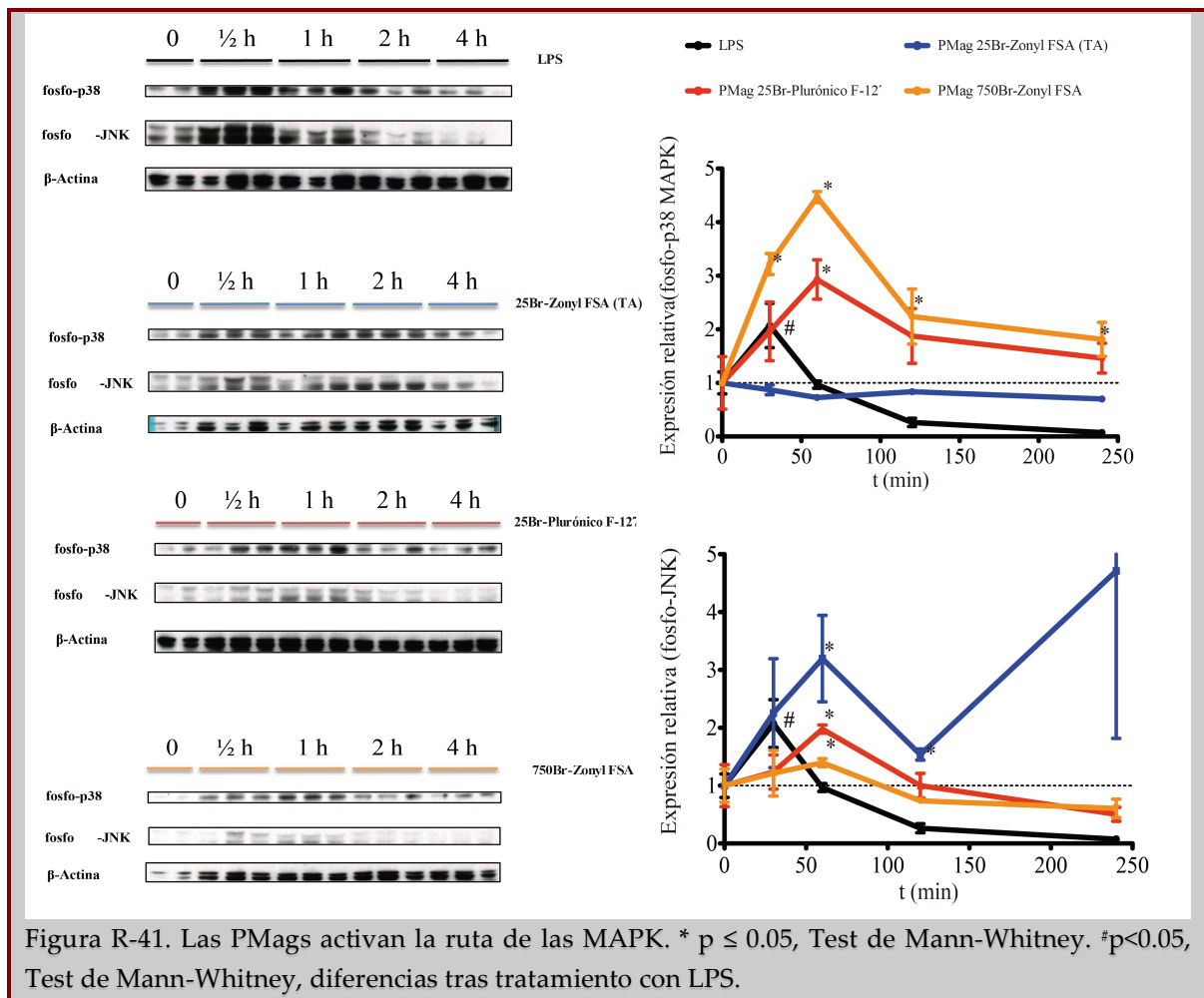


Usamos lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared bacteriana que induce una pléyade de genes vinculados con la activación de macrófagos, incluyendo iNOS, CCL5 y CCL17. Sin embargo, PMag 25Br-Plurónico F-127 y 750Br-Zonyl FSA inhibieron la

expresión del transcrito de iNOS al igual que de TGF- β (*Figura R-39*). Adicionalmente, los perfiles de expresión de genes inducidos por estas dos nanopartículas mostraron una similitud significativa (*Correlación de Pearson*, $R^2= 0.8399$; $p<0.0001$), pero distinta de la inducida por LPS (*Correlación de Pearson*, $R^2=0.08042$, $p=0.6841$, y, $R^2=0.02669$, $p=0.4563$, *respectivamente*) (*Figura R-40*). Este perfil de expresión génica inducida y la inducción de citoquinas estudiada sugieren que las PMags, excepto la 25Br-Zonyl FSA (TA), activan fuertemente a los macrófagos hacia un fenotipo M1.

3.5.3. *Las PMags activan a las MAPKs*

Una de las moléculas en la superficie celular que podrían interactuar con PEI es TLR-4. La activación de TLR-4 y la subsecuente actividad de la proteína de andamiaje MyD88 conllevan a la activación de la ruta de las MAPK quinasa. Los mediadores de esta ruta, p38 y JNK, activan al factor de transcripción AP-1 por fosforilación, y I κ B que induce la activación de NF κ B. Para verificar la activación de la ruta dependiente de TLR-4, analizamos los niveles de fosforilación de p38 y JNK en lisado de células RAW264.7 tratadas con PMags. Para el estudio cinético, incubamos las células con las nanopartículas por 0, 30, 60, 120, y 240 minutos. Tanto PMag 25Br-Plurónico como 750Br-Zonyl FSA indujeron la fosforilación de p38 MAPK y JNK desde los 30 minutos de tratamiento (*Figura R-41*) alcanzando su máximo a los 60 minutos. Aunque PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no indujo la fosforilación de p38 MAPK, la fosforilación de JNK aumentó tras el tratamiento con estas nanopartículas.



3.5.4. Las PMags incrementan el metabolismo del hierro

Puesto que la internalización de nanopartículas de óxido de hierro y su posterior degradación por la maquinaria molecular de las células podría activar el metabolismo del hierro, analizamos los niveles de expresión de IRP2 (del inglés *iron-responsive element-binding protein 2*), una proteína que responde rápidamente a las variaciones de Fe^{2+} . El tratamiento con todas las PMags, excepto PMag 750Br-Zonyl FSA, indujo un decrecimiento de los niveles de IRP2 (Figura R-42, A). Este decrecimiento coincidió con una disminución de los niveles de expresión del gen de IRP2. Además, el tratamiento con PMags indujo la expresión de la ferroportin-1 (Slc40a1) y de la cadena ligera de la

ferritina (del inglés *Ferritin light chain*), dos importantes proteínas involucradas en la exocitosis del Fe^{2+} (Figura R-42, B).

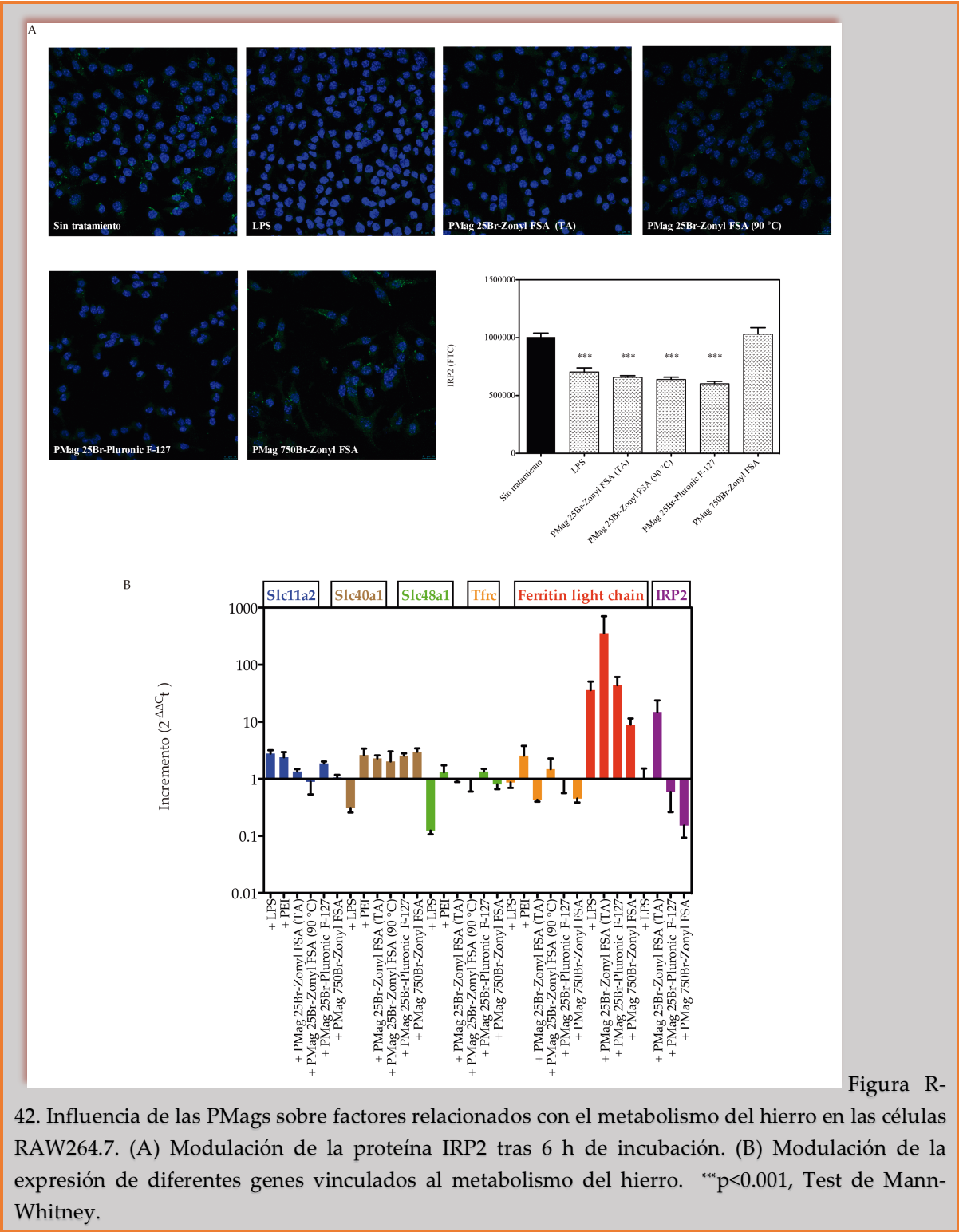


Figura R-

42. Influencia de las PMags sobre factores relacionados con el metabolismo del hierro en las células RAW264.7. (A) Modulación de la proteína IRP2 tras 6 h de incubación. (B) Modulación de la expresión de diferentes genes vinculados al metabolismo del hierro. *** $p < 0.001$, Test de Mann-Whitney.

3.5.5. La activación de macrófagos RAW264.7 por PMags depende parcialmente de TLR4 y EROs

Para confirmar que las PMags podrían tener un efecto sobre TLR-4, pre-tratamos las células RAW264.7 con el inhibidor de TLR-4, CLI-095, durante 2 h, e inmediatamente las tratamos con PMag (6.25 µg/ml) por 6 h. En las células pre-tratadas con el inhibidor, las PMags no fueron capaces de inducir la expresión *de novo* de los transcritos de IL-1b ni del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vegfa*) (*Figura R-43, A*), sugiriendo el involucramiento de TLR-4 en la activación dependiente de PMag.

Como era esperado, la inhibición de la señalización por TLR-4 redujo significativamente la inducción de *Ccl2*, *Ccl3* y *Ccl4* por LPS; sin embargo, no afectó la inducción de estas quimioquinas por las PMags (*Figura R-43, A*). Por lo tanto, TLR-4 está solo parcialmente involucrado en la activación inducida por estas nanopartículas.

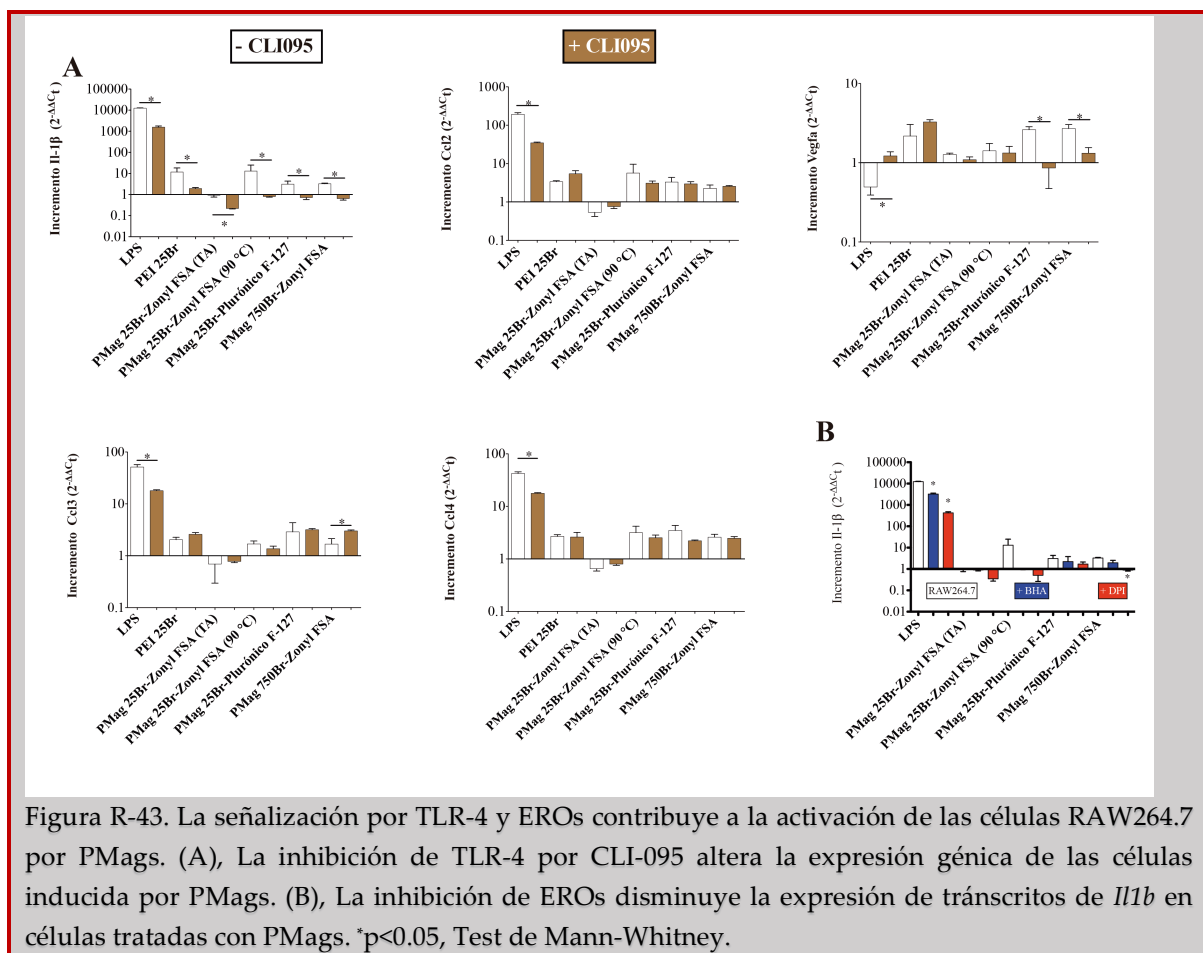


Figura R-43. La señalización por TLR-4 y EROs contribuye a la activación de las células RAW264.7 por PMags. (A), La inhibición de TLR-4 por CLI-095 altera la expresión génica de las células inducida por PMags. (B), La inhibición de EROs disminuye la expresión de transcritos de *Il1b* en células tratadas con PMags. *p<0.05, Test de Mann-Whitney.

Para analizar el involucramiento de EROs en la activación de los macrófagos, pre-tratamos células RAW264.7 con el reactivo hidroanisol butilado (BHA) que reacciona con EROs conllevando a su eliminación, o el inhibidor de la NADPH oxidasa, yoduro de definileno (DPI), y a continuación, activamos las células con PMags. Los niveles inducidos de transcrito de Il1b mostraron una tendencia a disminuir en presencia de todas las PMags, que fue significativo para PMag 750Br-Zonyl FSA (*Figura R-43, B*). Estos datos sugieren que la señalización por TLR-4, y en menor medida, por EROs, está involucrada en la respuesta de los macrófagos a PMags.

A continuación analizamos los niveles de fosforilación de p44/p42 MAPK (Erk1/2). El tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 incrementó la fosforilación de p44/p42 MAPK (*Figura R-44*). El pre-tratamiento con el inhibidor de TLR-4 redujo el nivel de fosforilación de p44/p42 MAPK en las células RAW264.7 tras tratamiento con PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) y 25Br-Plurónico F-127 (*Figura R-44*).

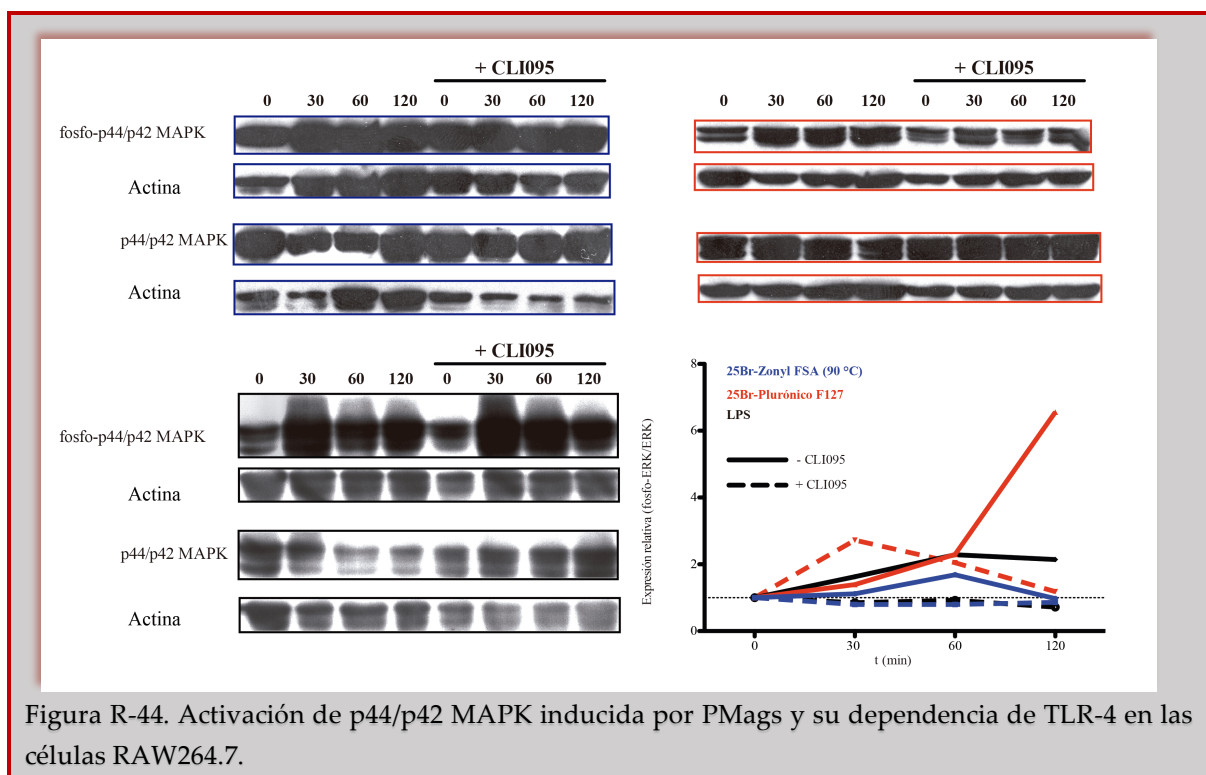
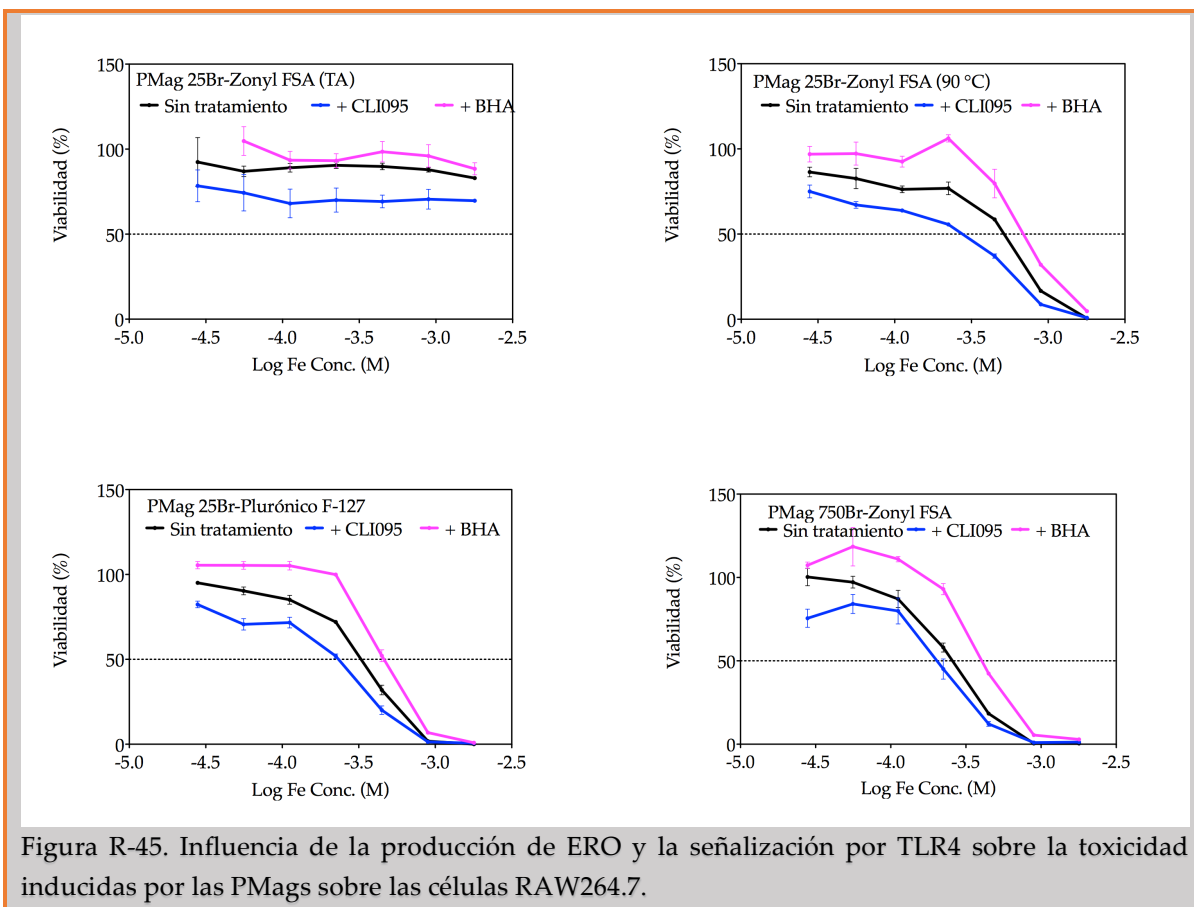


Figura R-44. Activación de p44/p42 MAPK inducida por PMags y su dependencia de TLR-4 en las células RAW264.7.

Es importante precisar que en el rango de concentraciones en los que se usaron, los tratamientos con estos inhibidores (BHA y CLI-095) no alteraron la viabilidad de las células. El tratamiento con BHA parcialmente rescató a las células RAW264.7 de la toxicidad inducida por estas nanopartículas a altas concentraciones, en tanto, el pre-tratamiento con CLI-095 exacerbó esta toxicidad (*Figura R-45*).



3.5.6. Las PMags modulan la dinámica de podosomas en los macrófagos RAW264.7

Los podosomas son estructuras adhesivas ricas en actina que permiten la migración celular y la invasión a través de factores escultores de la matriz extracelular tales como metaloproteinasas (MMP), especialmente la MMP9 y la MMP2. Puesto que las PMags modulan la activación de los macrófagos, analizamos cómo estas nanopartículas afectan la habilidad de los macrófagos para formar podosomas.

Tratamos las células RAW264.7 con PMag (6.25 $\mu\text{g/ml}$) por 6 h, las fijamos para el marcaje de filamentos de actina (Faloidina-TRITC), el marcador de podosomas, vinculina, y el núcleo (DAPI). Los podosomas pueden definirse como la acumulación de actina (puntos), usualmente rodeados por la vinculina (*Figura R-46, cabeza de flechas*) en la zona ventral de las células. Comparado con las células sin tratamiento, las células tratadas con PMags incrementaron tanto la densidad de podosomas como el número de estas estructuras por células. Sin embargo, las células tratadas con LPS disminuyeron la densidad de podosomas tras 6 h de tratamiento (*Figura R-46*). Solo se observó una variación significativa en área de la células en las tratadas con LPS (aumenta) o PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (disminuye).

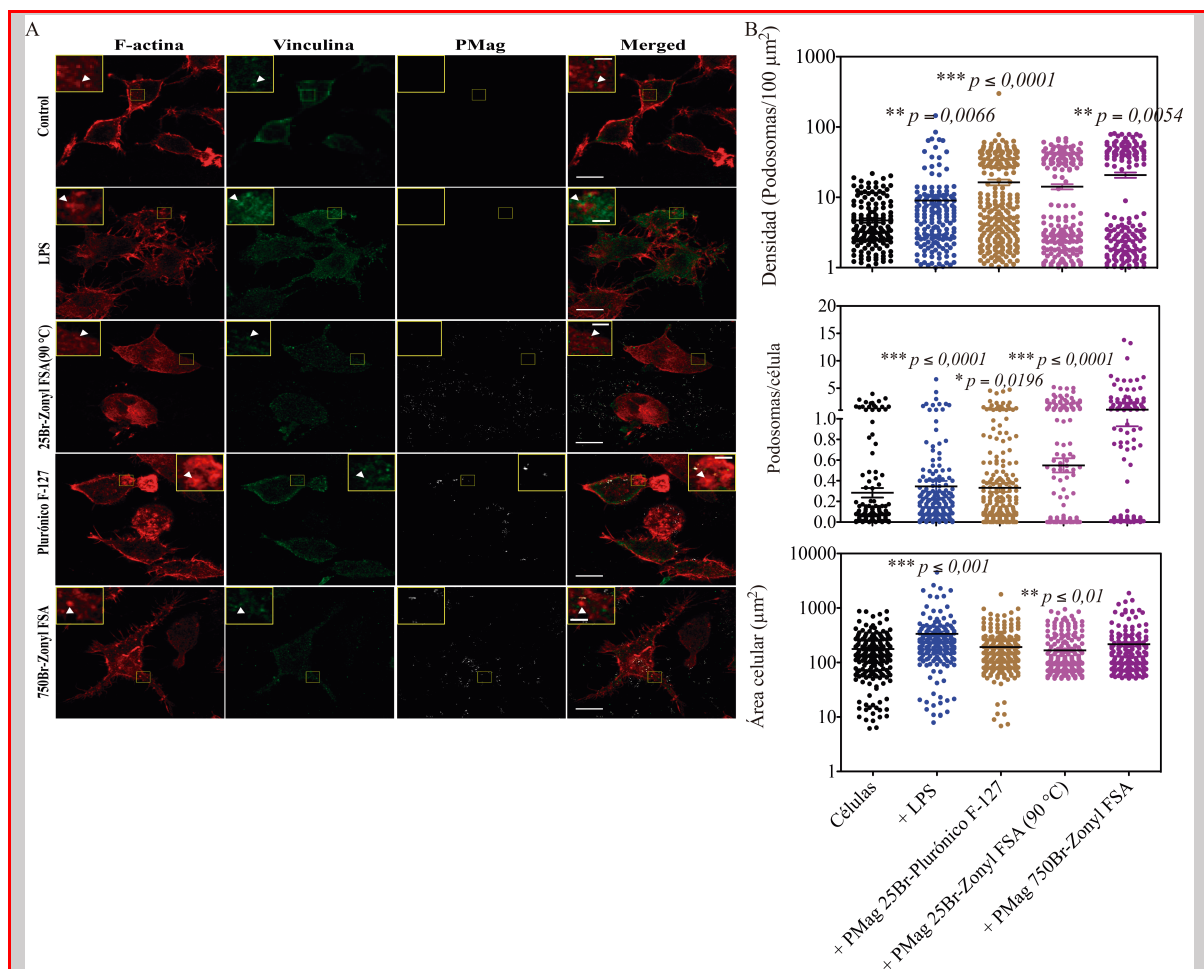
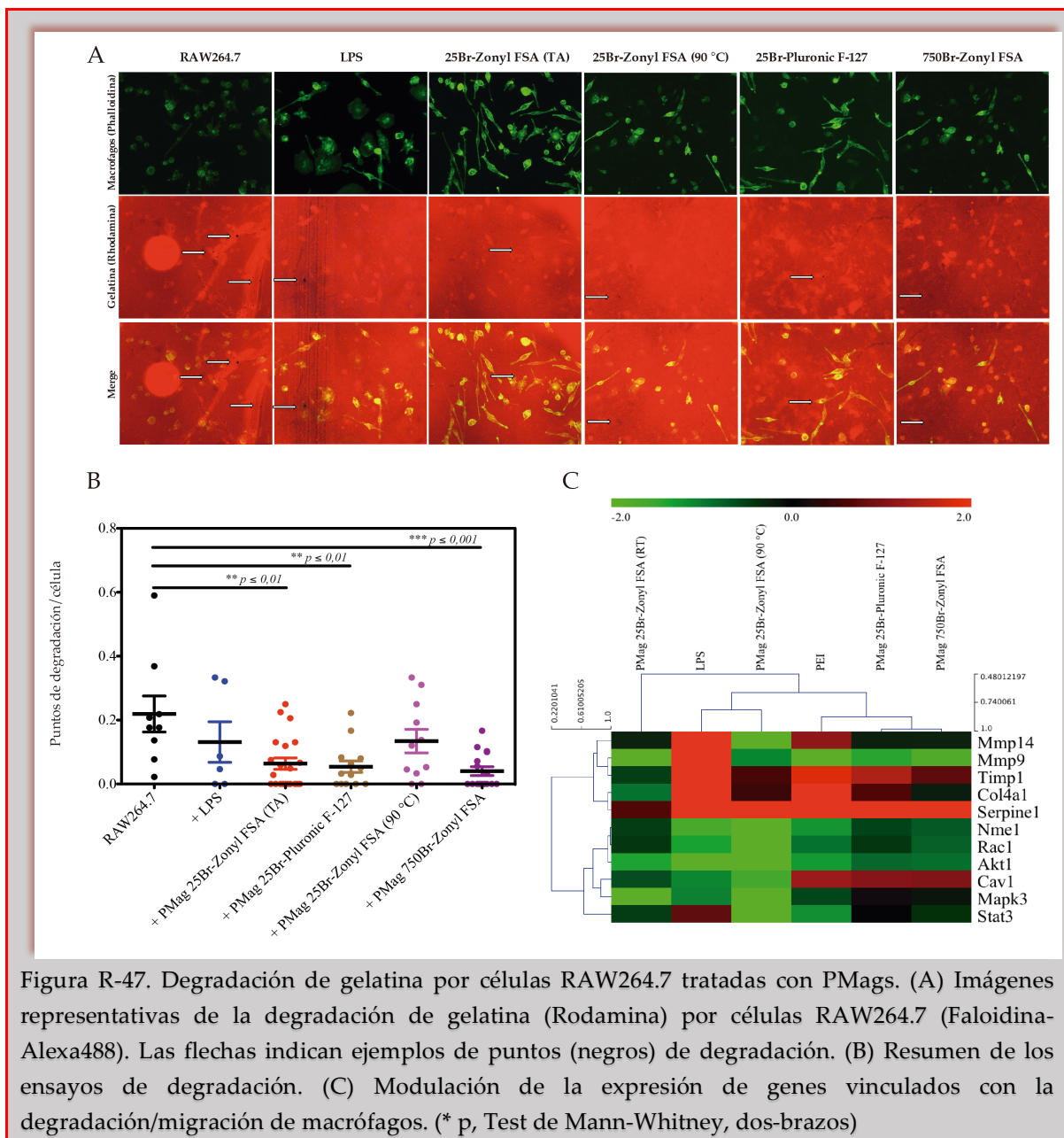


Figura R-46. Dinámica de podosomas inducido por el tratamiento con PMags en células RAW264.7. (A) Imágenes representativas de podosomas visualizadas por la co-tinción de F-actina

y vinculina (Merged: combinado). (B) Resumen de la densidad de podosomas, (C) el número de podosomas por células, y (D) el área de la célula, basados en tres experimentos independientes (Test de Mann-Whitney, dos-brazos).

Para comprobar si el aumento en la densidad de podosomas se traduce en un incremento de la degradación por parte de los macrófagos, sembramos células RAW264.7 sobre cubre-objetos recubiertos con gelatina marcada fluorescentemente (rodamina) y tratamos las células con PMag (6.25 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h. A pesar del incremento de podosomas, las células RAW264.7 tratadas con PMags mostraron una capacidad reducida de degradación de gelatina comparada con las células sin tratamiento (*Figura R-47, A y B*). PMag 750Br-Zonyl FSA indujo la mayor inhibición de degradación detectada. El tratamiento con LPS no afectó significativamente la capacidad degradativa de las células RAW264.7.

La capacidad degradativa reducida coincidió con una disminución de la expresión de genes vinculados con este proceso, incluyendo *Mmp9*, *Akt1*, *Rac1*, y *Stat3* (*Figura R-47, C*). La expresión de los inhibidores de metaloproteinasas, *TIMP1* y *serpin E1*, aumenta tras tratamiento durante 6 h con PMags (*Figura R-47, C*). La expresión de *Mmp14*, la metaloproteinasa responsable de la iniciación del proceso de degradación por podosomas, aumentó con el tratamiento con LPS, pero disminuyó con el tratamiento de las PMags. *Mmp9* igualmente aumentó con el tratamiento con LPS, aunque *Timp1* y *SerpinE1* aumentaron también.



Finalmente, MMP2 disminuyó con el tratamiento con PMag 25Br-Plurónico F-127, particularmente en su forma activa, aunque no hubo reducción de MMP2 en las células tratadas con LPS o PMag 25Br-Zonyl FSA (90 °C) (Figura R-48).

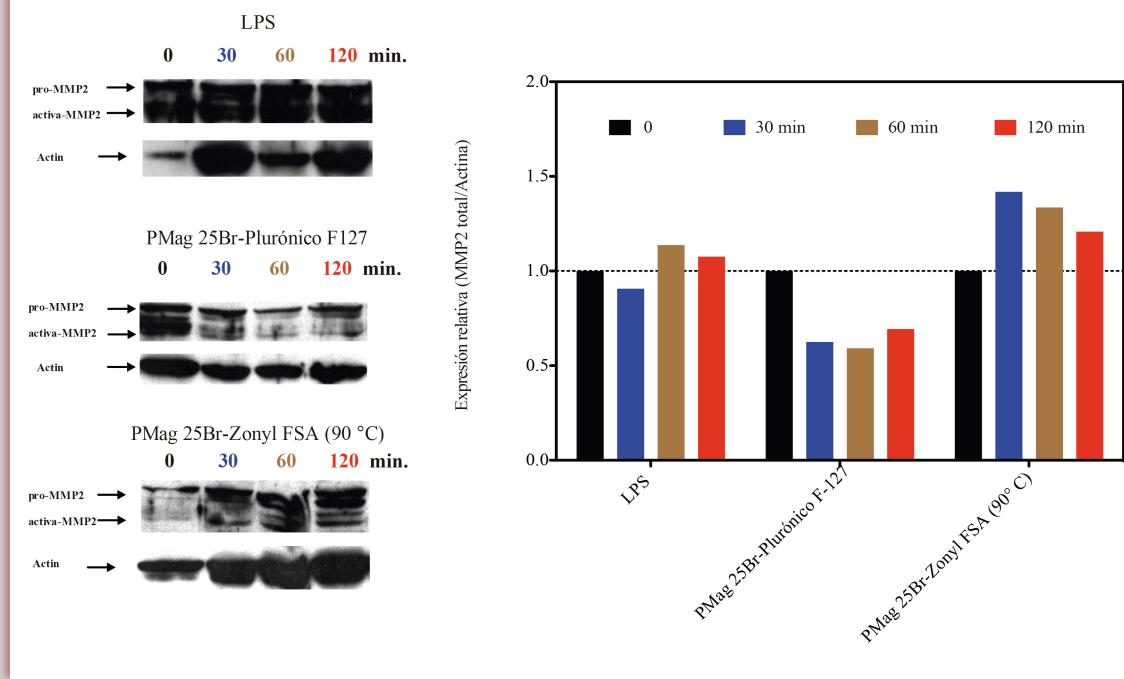


Figura R-48. Las PMags inducen diferencialmente la maduración de MMP2.

4. Discusión

Nanopartículas magnéticas recubiertas con polietilenimina como agentes transfectantes

En la última década, se han hecho ingentes esfuerzos para mejorar la eficiencia de la transfección génica tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de las variantes que ha cobrado esfuerzos crecientes ha sido la basada en nanopartículas magnéticas capaces de conjugación con ADN/ARN como plataforma terapéutica génica [48, 175]. Este interés se basa en la posibilidad de concentrar las nanopartículas en la masa tumoral con ayuda de un campo magnético externo aplicado en la zona de interés, posibilitando así que las células estromales y tumorales internalicen eficientemente el nanomaterial con la droga de interés. Esta filosofía busca evitar o paliar los efectos secundarios derivados de muchos tratamientos convencionales y pioneros debido a la biodistribución sistémica y no localizada del fármaco [176, 177].

Para este estudio, hemos sintetizados una batería de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas con poli-etilénimina, un polímero ampliamente utilizado en transfección [168]. Todas mostraron citotoxicidad frente a varias líneas celulares al incrementar su concentración, pudiéndose deber a la propia poli-etilénimina, conocida por inducir muerte celular a concentraciones elevadas [178]. El mecanismo de transfección propuesto para los policationes, y PEI en particular, se basa en la ruptura del endosoma temprano debido a una actividad de bomba de protones elevada, con la

consiguiente ósmosis y aumento del volumen de los endosomas. De hecho, se ha visto en muchos casos que las nanopartículas inducen ruptura o desestabilización de los compartimentos endosomales y/o lisosomales, provocando que su contenido entre en contacto con el citosol y, como consecuencia, se induzcan mecanismos de muerte celular como activación de caspasas, cambio de potencia de membrana de las mitocondrias, o producción de EROs [113, 179].

En este estudio demostramos que la internalización de los conjugados pEGFP/PMag depende en gran medida de la endocitosis mediada por caveolina, como ha sido demostrado para los conjugados DNA/PEI [179, 180]. Sin embargo, la endocitosis mediada por clatrina también parece estar involucrada aunque en menor medida. La eficiencia de transfección de las nanopartículas aquí estudiadas podría, entonces, deberse a la preferencia por la ruta de endocitosis dependiente de caveolina, conocida por no incluir fusión con compartimento lisosomales, o no preferencialmente, y, de esta forma, impedir la degradación parcial o total del contenido transportado [181].

Hemos demostrado que las nanopartículas magnéticas recubiertas con poli-etilénimina también son capaces de introducir apropiadamente ARN interferentes e inducir la disminución de la expresión de la diana, en nuestro caso, de Bcl-2. Estos resultados se asemejan a otros en los que SPIONs recubiertas por PEI u otras polimerizaciones son capaces de internalizar apropiadamente ARN interferentes, provocando el silenciamiento del gen en cuestión [182, 183].

Bioactividad intrínseca sobre células Pan02.

Aunque, las SPION recubiertas con PEI se han utilizado como agentes de transfección, poco se conoce sobre los efectos que estas nanopartículas tienen en distintos tipos celulares. En el presente trabajo, analizamos tales efectos a nivel molecular y celular sobre la línea celular de carcinoma murino, Pan02 (*Figura D-1*). Puesto que la toxicidad de las PMags aumenta en la medida en que aumentamos su concentración, los estudios llevados

a cabo se realizaron a concentraciones sub-letales (6.25 µg/ml), para evitar la interferencia de los procesos de muerte celular con los aquí analizados.

La inducción de estrés oxidativo en células tras tratamiento con partículas de óxidos de hierro es una consecuencia directa de la internalización de los mismos [184]. La producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) conlleva a la activación de varios procesos celulares [185]. Por ello, el tratamiento de las células Pan02 con PMags, que produce un incremento de EROs, podría activar la maquinaria molecular que restringe los posibles daños provenientes de las reacciones redox. En este sentido, los niveles de transcritos de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo y metabolismo del hierro se afectaron por el tratamiento con PMags. Las enzimas codificadas por estos transcritos están involucradas en la descomposición del superóxido en oxígeno e peróxido de hidrógeno (SOD, del inglés *superoxide dismutase*); a su vez, el peróxido de hidrógeno es descompuesto por la enzima catalasa (CAT) en agua y oxígeno [185]. De esta forma, se eliminan los remanentes de EROs.

Como consecuencia posible de la producción de EROs, varias rutas de señalización se vieron afectadas, incluyendo la elevación de los niveles de sirtuína-1 que, a tenor con otros estudios en los que SIRT1 participa en la protección celular contra el daño oxidativo [186, 187], en nuestro caso podría ser un mecanismo igualmente de defensa contra la elevación de los niveles de estrés oxidativo. De hecho, la inhibición de EROs por BHA no solo impide la elevación de la expresión de SIRT1 tras el tratamiento con dos de las nanopartículas estudiadas, sino también inhibe la expresión basal de esta proteína. Sirtuína-1 es una proteína con actividad deacetilasa (tipo III de la familia de las HDAC, del inglés *histone deacetylases*), cuyas dianas incluyen a factores importantes para la biología tumoral como p53, NF-κB, y el factor de transcripción FOXO3 [188]. Es precisamente a través de la desacetilación de este último que SIRT1 contrarresta el exceso de EROs, puesto que la desacetilación de FOXO3 conlleva a la sobre-expresión de la catalasa y MnSOD [187]. Incluso, el aumento de la expresión de la catalasa así como de las

dismutasas que observamos en nuestro estudio, podría, en parte, deberse a la propia actividad enzimática de SIRT1 a través de la activación del factor de transcripción FOXO3.

Algunos trabajos demuestran que moléculas anti-oxidantes como la vitamina D protegen las células del daño producido por EROs a través del incremento de SIRT1 vía la activación de Erk1/2 [186]. Un mecanismo similar se ha descrito en la protección de células neuronales tras un daño cerebral [189]. Las modificaciones de SIRT1 dependientes de EROs parecen afectar su estabilidad, lo que finalmente conlleva a su migración del núcleo al citoplasma donde es degradado por el proteasoma [115]. Por eso, hipotetizamos que el aumento inicial en el nivel de SIRT1 es una de la respuesta temprana de las células ante el estrés oxidativo; pero al cabo de las 24 h, este mismo estrés modifica SIRT1 provocando su degradación. Sin embargo, las EROs regulan la disponibilidad de SIRT1 mediante la oxidación de varios de sus residuos [190]. Este último mecanismo podría explicar el comportamiento bifásico de la expresión de SIRT1 tras tratamiento con nanopartículas, con un aumento a las 2 h como un mecanismo frente al estrés oxidativo y su disminución a las 24 h por regulación negativa de su función por oxidación.

En cuanto al metabolismo del hierro, el incremento de los transcritos de la ferroportina-1 (Slc40a1) y del transportador de metales divalentes (DMT1, del inglés *divalent metal transporter-1*), ambos involucrados en los procesos de exocitosis de Fe^{2+} , es un reflejo de la necesidad de eliminar el Fe^{2+} en exceso. Por otra parte, el transcrito para el receptor de transferrina, implicado en la endocitosis de Fe^{2+} , disminuye dando lugar a una respuesta celular que garantice la incorporación no continuada de este catión a la célula. Las variaciones en el transcritoma asociado al estrés oxidativo y metabolismo del hierro sugieren un programa de respuesta complejo que contrarresta el exceso intracelular de hierro y la consecuente sobreproducción de EROs, en concordancia con estudios previos [191].

El microRNA-21 está implicado en la supervivencia de las células tumorales, mediante la regulación de varios factores involucrados en la proliferación, la invasión [192], y apoptosis [193]. La regulación negativa de PTEN, Sprouty1, y Bcl-2 conlleva a la exacerbación descontrolada de la proliferación, y a la resistencia a la muerte celular. De hecho, Sprouty1, un regulador negativo de la proliferación [97], aumenta sus niveles proteicos a las 2 h de tratamiento con PMags, coincidiendo con la disminución de los niveles de microRNA-21 maduro. Sin embargo, el nivel de su transcrito disminuye, sugiriendo que el efecto regulador del microRNA-21 sobre Sprouty1 tiene lugar a nivel traduccional. La expresión génica de otros dos de las dianas moleculares del microRNA-21, PTEN y PDCD4, aumentan al mismo tiempo que disminuye el nivel del microRNA. Aunque, microARN-21 no solo recupera su nivel basal, sino que aumenta a las 24 h, sus dianas incrementan sus niveles, lo que sugiere que otros factores independientes de microRNA-21 podrían estar regulando su expresión.

De hecho, en contradicción con el aumento de la proteína anti-proliferativa, Sprouty1, dos ciclinas reguladoras del ciclo celular (ciclina A1 y D1) [194, 195], aumentan significativamente. Sin embargo, este incremento en sus niveles podría estar relacionado con el propio aumento a las 24 h del microRNA-21, puesto que se ha demostrado que este microRNA regula positiva e indirectamente la traducción de la ciclina D1 en hepatocitos [196]. Notablemente, este efecto del tratamiento con PMags sobre las ciclinas mencionadas parece depender de EROs, puesto que la eliminación parcial de estas especies reactivas, por el compuesto BHA, impidió el aumento de la ciclina A1 y D1. Un estudio arrojó que la producción de EROs endógeno induce la proliferación a través de la inducción transiente de la ciclina D1 [197]. Por el contrario, otros reportan que la presencia de EROs regula negativamente la ciclina D1 en células HepG2, donde indujo una parada del ciclo celular en G1/S [198]. En nuestro caso, las EROs parecen ser las responsables, en parte, de la expresión de las ciclinas en células tratadas con PMags, pero no afectan la proliferación celular.

La señalización dependiente de las MAPK, específicamente, de p44/p42 MAPK (Erk1/2) está estrechamente relacionada con procesos de proliferación y supervivencia. El incremento de factores dependiente de la fosforilación de Erk1/2 como microRNA-21 (24 h) y SIRT1 (2 h), sugerían que tal ruta es activada con el tratamiento con PMags. De hecho, detectamos un aumento del nivel de fosforilación de Erk1/2 a las 2 h de tratamiento con PMags. Aún más importante, tal proceso depende de la presencia de EROs, puesto que la eliminación parcial de EROs con BHA, redujo la inducción de p-Erk1/2.

La señalización por NOTCH1 participa en la iniciación y mantenimiento de procesos tumorigénicos; particularmente, en carcinoma pancreático se ha demostrado que regula positivamente la proliferación celular [199]. Por otra parte, las rutas dependientes de EROs y NOTCH1 cooperan entre ellas en la regulación de los procesos celulares que conllevan a la invasión por parte de las células tumorales [116]. En nuestro estudio demostramos que las PMags, aunque no inducen un incremento significativo de la expresión de NOTCH1, sí inducen un aumento del nivel de Jagged1, uno de sus ligandos naturales. Puesto que el tratamiento con BHA redujo el incremento de Jagged1 a las 24 h de tratamiento con PMag, la sobre-producción de EROs parece ser el causante de la sobre-expresión de Jagged1 como una respuesta de supervivencia de las células ante el estrés oxidativo inducido. Sin embargo, el aumento de Jagged1 no aumentó la proliferación de las células de adenocarcinoma murino pancreático, Pan02, ni su invasividad.

En concordancia, pese al incremento de las ciclina A1 y D1, no observamos un incremento de la proliferación de las células de adenocarcinoma pancreático murino, Pan02. Este efecto puede ser el resultado del balance entre la expresión de factores pro- y anti-proliferativos, y en consecuencia, las células mantienen su ciclo normal de proliferación. Tal es el caso de la ligasa E3, c-Cbl, asociada a anergia celular [200], que, como Sprouty-1,

regula negativamente la señalización por receptores tirosina quinasas, y puede limitar la proliferación celular [97, 201].

La migración/invasión de células tumorales está regulada por varias rutas de señalización, incluidas, la dependiente de microARN-21 [92, 94]. c-Cbl también modula negativamente la capacidad invasiva de las células tumorales a través de la ubiquitinación de varias proteínas involucradas en este proceso celular [100]. De esta forma, detectamos un incremento de la expresión de c-Cbl con el tratamiento con las nanopartículas, que se correspondió con una disminución de la capacidad invasiva de las células de adenocarcinoma pancreático. En concordancia, detectamos una menor capacidad invasiva a través de membrana basal intestinal, debido a una capacidad degradativa de colágeno IV disminuida. Este efecto puede explicarse por una reducción significativa en la densidad y número de invadosomas en las células tratadas con nanopartículas debido ya sea a la inhibición del rearreglo de la actina, o a alteraciones en las etapas iniciales de la formación de invadosomas. Este resultado indica que las nanopartículas recubiertas con PEI pueden reducir la invasividad de las células de adenocarcinoma pancreático murino. Como tal, las propiedades intrínsecas de estas nanopartículas, en principio desarrolladas para la terapia génica, pueden también proveerlas de actividad anti-metastásica, haciéndolas más atractivas para futuras exploraciones clínicas.

Desde un mero punto de vista mecánico, la fuerza de adhesión celular influye en la habilidad de las células para migrar. Fuerzas de adhesión al sustrato extremadamente fuertes o débiles causan la inhibición de la migración a través de la generación de anclaje estable o una pobre tracción. La interacción de nanopartículas inorgánicas con la red del citoesqueleto puede impedir los procesos migratorios. En este sentido, nanopartículas de TiO_2 , SiO_2 , e hidroxiapatita desestabilizan la red de microtúbulos en células epiteliales, y, por consiguiente, su migración [202]. Además, se ha demostrado que nanopartículas de TiO_2 y oro impiden la polimerización de tubulina *in situ* [203]. En concordancia con lo anteriormente expuesto, nuestros resultados indican que las nanopartículas de óxido de

hierro recubiertas con PEI pueden afectar al citoesqueleto e impedir la formación apropiada de invadosomas. Tal parece que la inhibición de la formación de estas estructuras es la causa principal de la reducida capacidad invasiva de las células de adenocarcinoma pancreático. Otro estudio también ha demostrado que SPION recubiertas con ácido gamboico inhiben la migración de células tumorales pancreáticas, aunque, en ese caso también inhibió la proliferación celular [204].

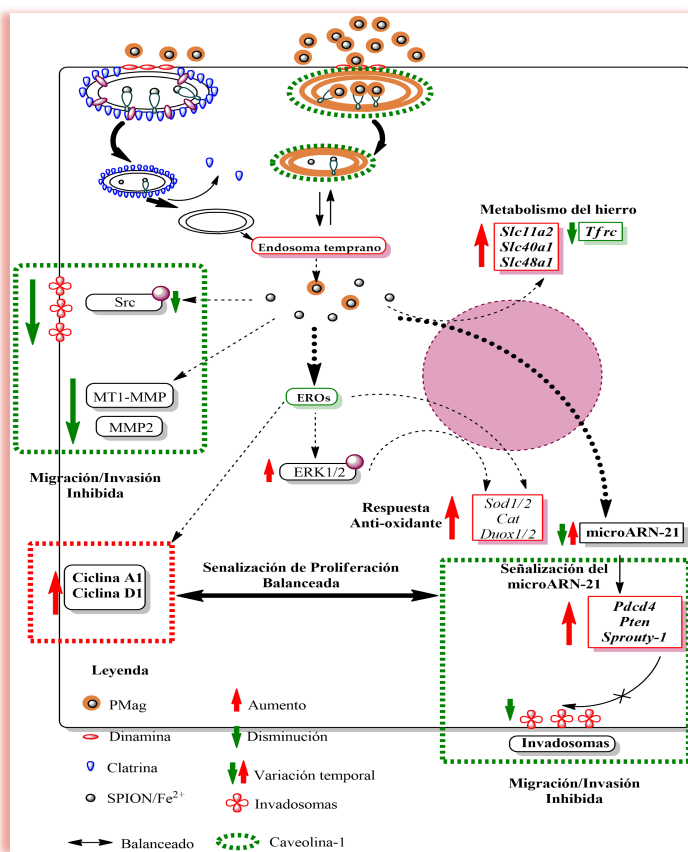


Figure D-1. Esquema general del efecto de nanopartículas recubiertas con polietilenoimina sobre células tumorales pancreáticas. Las PMags son internalizadas preferencialmente por endocitosis mediada por caveolina. La degradación de las nanopartículas conlleva al aumento del Fe^{2+} intracelular y a la producción de EROs. Como consecuencia, se modulan los transcriptomas asociados al metabolismo del hierro y a la respuesta anti-estrés oxidativo que contrarresta el exceso de hierro y EROs, respectivamente. Las EROs inducen el aumento de la expresión de factores reguladores del ciclo celular, las ciclinas A1 y D1, así como activación de Erk1/2. Sin embargo, las PMags también inducen los inhibidores de la proliferación celular Sprouty-1, PTEN, y PDCD4 a través

de la inhibición del microARN-21, conllevando a un equilibrio de señales pro- y anti-proliferativas. Concomitantemente, las nanopartículas impiden la formación de invadosomas a través de la inhibición de la activación de la quinaza Src y la disminución de la expresión de las metaloproteinasas MT1-MMP y MMP2, que, conjuntamente con el aumento de los inhibidores de la migración celular PDCD4Sprouty-1 y PTEN, contribuye a la inhibición de los procesos de migración/invasión de las células tumorales pancreáticas.

Aunque la interferencia mecánica de la nanopartículas con el citoesqueleto puede ser una de las causas de la disminución en la migración e invasión, la modulación de factores claves de los procesos celulares de migración es probablemente la mayor contribución a este efecto. En este trabajo, observamos una reducción temprana de la expresión de microARN-21 tras el tratamiento con nanopartículas. Notablemente, las dianas naturales de microARN-21, PDCD4, PTEN, y Sprouty-1, están involucradas en la regulación de la migración celular. PDCD4 limita la invasión de las células tumorales de pulmón tras la inhibición de microARN-21 [92]. Similarmente, Sprouty-1 inhibe el crecimiento y migración de las células tumorales de ovario a través de la disminución de fosfo-Akt [97]. Por otra parte, PTEN se asociado a la pérdida de vimentina y a la sobre-expresión de E-cadherina, induciendo como consecuencia la reversión de la transición epitelio-mesenquimal en las células tumorales, y, por ende, la migración celular [205].

Tras el tratamiento con PMags que provoca la reducción temprana de los niveles de microARN-21, observamos un aumento significativo de la expresión de *Pten* y *Pdcd4* que se mantuvo hasta las 24 h de seguimiento. En el caso de Sprouty-1, a pesar de la reducción temprana de la expresión génica, los niveles proteicos de Sprouty-1 aumentaron desde las 2 h de seguimiento. Por lo cual, hipotetizamos que el efecto anti-migratorio de las PMags sobre las células de adenocarcinoma pancreático, Pan02, ocurre, por lo menos en parte, a través de la inhibición de microARN-21 y la sobre-expresión de sus dianas moleculares PTEN, PDCD4 y Sprouty-1, y como consecuencia, a la inhibición de la transición epitelio-mesenquimal y a la migración celular. Otras nanopartículas han demostrado ser capaces de inhibir la [transición epitelio-mesenquimal](#)³⁸. Tal es el caso de las nanopartículas de oro que inhiben la proliferación tumoral y la migración a través de la disminución de la activación de MAPK y a una reversión de la transición epitelio-mesenquimal [206]. De igual forma, las nanopartículas de oro reducen el tamaño tumoral en dos modelos ortotópicos de cáncer de ovario debido a la reversión de la transición

³⁸ **Transición epitelio-mesenquimal:** proceso biológico por el cual una célula pierde su polaridad y gana capacidad migratoria e invasiva.

epitelio-mesenquimal mediado por la expresión de E-cadherina y la inhibición de la expresión de Snail y N-cadherina [206]. Igualmente, la inhibición de microARN-21 se ha vinculado con el efecto anti-metastásico de fármaco como el Resveratrol en células tumorales pancreáticas [192].

La disminución de la expresión de *Tgfb* también apoya esta hipótesis. La señalización dependiente de TGF- β promueve la migración celular a través de la inducción de Snail [207]. Este factor está también asociado a la transición epitelio-mesenquimal, por el que promueve la migración celular y la invasión [208]. De esta forma, la disminución de *Tgfb* puede impedir la señalización autocrina y paracrina, y, eventualmente, causar la inhibición de la migración.

Aunque la expresión de varios genes vinculados a la migración aumenta tras el tratamiento con nanopartículas, el inhibidor SerpinE1 aumenta concomitantemente. El inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1 o SerpinE-1) es un inhibidor extracelular de la actividad de las metaloproteinasas. Típicamente, la presencia de PAI-1 inhibe la actividad de la plasmina que se requiere para el corte de las pro-metaloproteinasas en su forma activa [209]. Esta podría ser la causa de que, aun cuando el transcrito de MMP2 y MMP9 aumentan, la actividad proteolítica de ambas puede verse inhibida por la presencia de PAI-1. PAI-1 no solo afecta la invasión a través de la inhibición de la actividad de las metaloproteinasas, sino también a través del control de varias rutas de señalización intracelulares, como Jak1/STAT1 [210]. Incluso a bajas concentraciones, PAI-1 promueve el rearrreglo del citoesqueleto y la pérdida de adhesiones focales, ambos procesos importantes en la formación de invadosomas [211]. Con lo que podemos especular que SerpinE1 no solo inhibe la actividad de las metaloproteinasas, y por ende la degradación de la matriz extracelular, sino también desestabiliza la formación de invadosomas, contribuyendo al efecto general de las nanopartículas. Además, PAI-1 inhibe la migración de otros tipos de células tumorales como las de próstata [212].

Incluso, el activador de la plasminógeno uroquinasa, uPA, está asociado a la capacidad metastásica [213].

En resumen, las PMags no solo activan los mecanismos moleculares del metabolismo del hierro y anti-oxidativo, sino también, inhiben la capacidad de migración/invasión de las células tumorales pancreáticas, sugiriendo su uso en estrategias anti-metastásicas.

Bioactividad intrínseca sobre células endoteliales y fibroblastos.

En este trabajo hemos caracterizado el efecto que tiene el tratamiento de las PMags sobre la expresión de varios genes vinculados con respuesta inmune y angiogénesis en células endoteliales de ratón (células SVEC4-10, como modelo celular de células endoteliales). El estudio arrojó la inducción de la expresión de varias quimioquinas involucradas en los procesos de angiogénesis como CXCL1, CXCL2 y CXCL3. Igualmente, se indujo la sobreexpresión de factores involucrados en la respuesta inmune como IL-6, TNF- α e IL-23. Curiosamente, se redujo la expresión de TGF- β , que inhibe la respuesta inmune [214], con lo cual el balance de expresión génica inducido podría favorecer una respuesta inmune T_H1 .

Las SPIONs recubiertas con PEI inhibieron la capacidad invasiva de las células endoteliales según ensayos de cierre de herida *in vitro*. Se ha demostrado que altas concentraciones de nanopartículas de óxido de hierro intracelular desestabilizan la red de microtúbulos en células endoteliales humanas, así como la señalización mediada por FAK (del inglés, *focal adhesion kinase*) [215]. Similarmente, se ha demostrado que nanopartículas de oro inhiben la migración y la angiogénesis inducida por VEGF de células del endotelio vascular humano mediado por cambios en la ultraestructura de la membrana celular y el citoesqueleto [216]. Incluso, SPION recubiertas con dextrano, actualmente en uso como agente de contraste en clínica, compromete la integridad del endotelio [217].

En el caso de los fibroblastos, la inhibición de CXCL2 y el aumento de CCL4, CXCL1 y CXCL5 inducido por el tratamiento de las PMags sugieren que estas nanopartículas

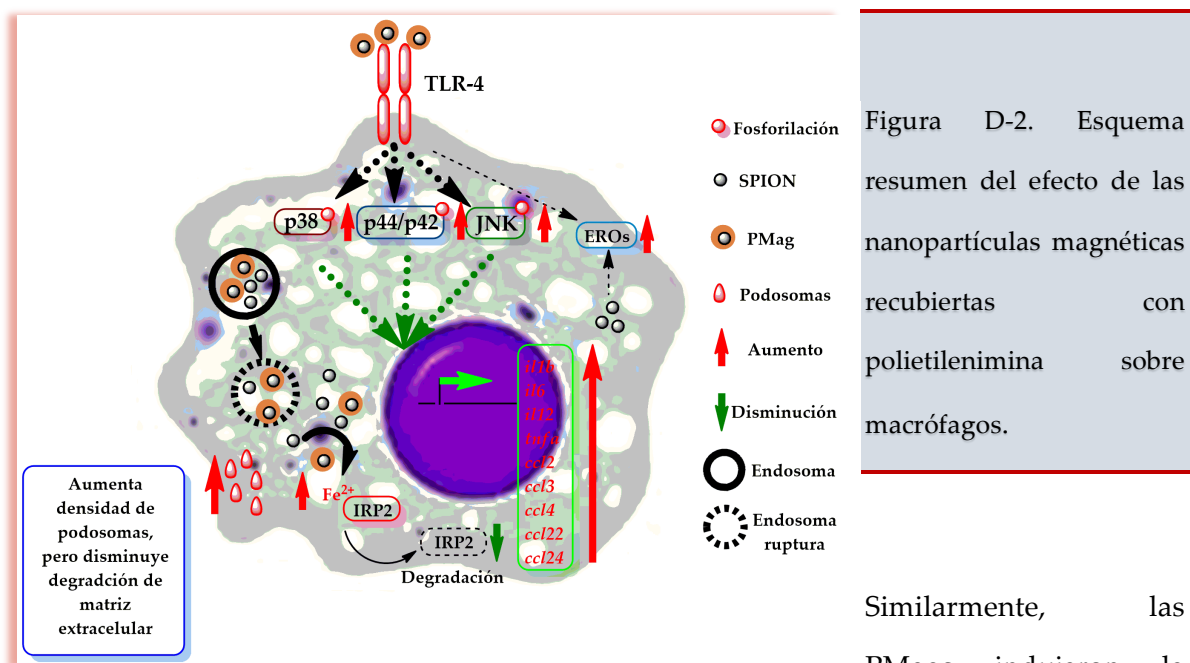
podrían interactuar con los fibroblastos del estroma tisular e inducir cambios fisiológicos importantes, contribuyendo a la respuesta inmune y a los procesos de angiogénesis. De hecho, CXCL1, CXCL2 y CXCL5 son tres quimioquinas angiogénicas cuyo receptor común es el CXCR2 [218, 219]. Por lo tanto, es comprensible que en un escenario *in vivo* el tratamiento con PMag podría inducir la secreción de quimioquinas por fibroblastos, cuyo balance determinará qué proceso prevalecerá, la angiogénesis o la angiostasis

En resumen, las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con PEI inducen cambios celulares importantes en células endoteliales y fibroblastos, pudiendo contribuir a la respuesta inmune y angiogénesis *in vivo* en modelos animales. Notablemente, PEI por sí solo induce efectos similares, lo que sugiere que parte de la bioactividad de esta nanopartículas puede deberse al polímero.

Bioactividad intrínseca sobre células del sistema fagocítico mononuclear; propiedades adyuvantes.

Se ha descrito que tanto la polietilenimina (PEI) como el óxido de hierro son capaces de alterar la respuesta inmune; PEI actúa como un potente adyuvante a través de la activación de la señalización dependiente de TLR-4 [132], pero los efectos del óxido de hierro son contradictorios, dependiendo de la concentración ruta de inmunización, etc. [163, 166]. De allí, que la inmunogenicidad de la combinación de ambos en una sola formulación fuera de nuestro interés. Demostramos que las PMags inducen la secreción de IL-12 por las células RAW264.7, una línea celular murina similar a macrófagos, y por las células diferenciadas con PMA, THP1, una línea pro-monocítica humana. Sin embargo, a diferencia de otros estudios con PEI [132, 162], las PMags indujeron igualmente la secreción de IL-10 por parte de las células diferenciadas THP1. Notablemente, PMag 25Br-Zonyl FSA (TA) no indujo la secreción de IL-12; incluso, inhibió la secreción de IL-10 por parte de las células THP1, confirmando las diferencias funcionales entre esta y el resto de las PMags. La inducción de IL-10 podría deberse al núcleo de óxido de hierro, puesto que se ha demostrado que nanopartículas

superparamagnéticas de magnetita sin recubrimiento inducen la secreción de IL-10 en sangre heparinizada [220]. La activación de Erk1/2 con el tratamiento con PMags también podría contribuir a la producción de IL-10, puesto que los altos niveles de Erk activado están asociados con la producción de esta citoquina en macrófagos [221].



Aunque el perfil de inducción génica es similar entre las PMag 25Br-Plurónico F-127 Y PMag 750Br-Zonyl FSA, este difiere significativamente del inducido por lipopolisacárido (LPS). Encontramos que tal activación depende parcialmente de la señalización por TLR-4, puesto que la inhibición de este receptor con el compuesto CLI-095 redujo grandemente

la inducción de la expresión de *Il1b* y de *Vegfa*. Sin embargo, otros genes importantes en la respuesta pro-M1, como *Ccl2*, *Ccl3*, y *Ccl4*, no se vieron afectados tras inhibición con CLI-095, lo que sugiere que la inducción de dichos genes no depende solamente de la activación de TLR-4 por PMag.

Un incremento intracelular de PMag conlleva a una degradación del núcleo de magnetita a Fe^{2+} , lo que activa los mecanismos metabólicos relacionados con el hierro [191]. La proteína unidora de elementos respondedores al hierro (IRP2, del inglés *iron-responsive element (IRE)-binding protein*) es un factor importante asociado a la rápida respuesta inducida por Fe^{2+} [224]. Observamos un decrecimiento en los niveles de expresión de gen del IRP2 tras el tratamiento con PMag, probablemente debido al incremento del ión Fe^{2+} como resultado de la degradación de la magnetita. Este decrecimiento en IRP2 coincidió con un incremento en la expresión de la ferroportina-1 (*Slc40a1*) y la cadena ligera de la ferritina. En condiciones de bajo hierro intracelular, la IRP2 reprime la traducción tanto de la cadena ligera como pesada de la ferritina, así como de la ferroportina-1 a través de la unión a elementos en la región 5'UTR [225] y estabiliza el ARNm del receptor de transferrina y de DMT1 (*Slc11a2*) a través de la unión a elementos presentes en la región 3'UTR [122]. Por el contrario, IRP2 es degradado en condiciones de alta concentración de hierro intracelular, conllevando a una activación de la traducción de la ferritina y la ferroportina-1, y un decrecimiento en los niveles de los transcritos de DMT1 y del receptor de transferrina [122]. Esto sugiere que el incremento de PMag intracelular provoca alta concentración de Fe^{2+} , resultando en la degradación de la IRP2. Como consecuencia, la expresión de ferroportin-1 y la ferritina aumenta, y los niveles de receptor de transferrina tienden a disminuir. Este efecto, sin embargo, varía entre las diferentes PMags analizadas sugiriendo una velocidad de degradación diferencial dentro de las células.

Puesto que el óxido de hierro puede inducir EROs [226], unos de los mediadores de la respuesta inflamatoria, estos intermediarios podrían igualmente controlar algunos efectos

inducidos por las PMags en macrófagos. De hecho, las EROs parecen estar parcialmente involucradas en la activación inducida por PMag puesto que el tratamiento con BHA redujo la inducción de *Il1b*, pero no afectó la inducción de otros genes. Por tanto, TLR-4 y EROs solo están involucrados parcialmente en la activación, dejando abierta la posibilidad de que otros procesos estén mediando el efecto de las PMags sobre los macrófagos. Otros nanomateriales son capaces de activar a los macrófagos por distintas rutas que conllevan a la autofagia y a la señalización por TLR, como es el caso de los óxidos de grafeno [227]. Similar a nuestro estudio, las nanopartículas de óxido de cerio modulan negativamente la expresión de iNOS, lo que se traduce en una supresión de la respuesta inflamatoria, presumiblemente debida por el efecto “*scavenger*” de EROs [228]. Puesto que PEI está asociado con la ruptura de los compartimentos endosomales debido al llamado efecto esponja, este mecanismo podría parcialmente explicar el efecto de las PMags, activando factores que responden a la liberación de contenido endosomal al citoplasma. En este sentido, se ha demostrado que el agente lisosomatrópico L-leucil-L-leucina metil éster provoca la activación del inflamasoma NLRP3 a través de la fosforilación de JNK [229]. Teniendo en cuenta que observamos en nuestro estudio que JNK es fosforilado tras el tratamiento con PMag, es posible que un mecanismo similar al inflamasoma tenga lugar también en nuestro escenario experimental.

La migración de los macrófagos depende no solamente de la dinámica de formación de podosomas a nivel molecular [230], sino también, de las características fenotípicas/funcionales de los mismos. Los macrófagos periféricos escudriñan el microambiente tisular por daños peligrosos, y son células migratorias especializadas con un movimiento ameboide o mesenquimal. Este último tiene lugar en matrices extracelulares muy densas en los que el microambiente debe ser activamente degradado. En nuestro estudio, observamos que la densidad de podosomas de los macrófagos (RAW264.7) tratados con PMag aumenta. Como quiera que, el óxido de hierro induce EROs, además de la producción dependiente de la activación del TLR-4, y que se ha demostrado que estos intermediarios regulan la maquinaria vinculada con la formación

de podosomas, es tentativo sugerir que este incremento en la densidad y número de podosomas en los macrófagos se debe en parte a la inducción de EROs. De hecho, Src, una quinasa que participa en las etapas iniciales de formación de podosomas, es activada cuando se oxida por EROs [231]. Esta activación requiere de residuos de cisteína compartidos por otros miembros de la familia molecular, como Abl y Lck [232, 233].

Sin embargo, a pesar del incremento en la densidad de podosomas la actividad de degradación de gelatina disminuye en las células tratadas con PMag, similar a como sucede en macrófagos polarizados a fenotipo M1 [234]. Por el contrario a los macrófagos polarizados a M2, los polarizados a M1 no migran en arquitectura 2D ni 3D [234]; esto se debe probablemente a la necesidad de mantener en el sitio de la inflamación a los macrófagos. De la misma manera, la activación de macrófagos por PMag conllevaría a la acumulación de los mismos en los sitios donde se concentren las nanopartículas, permitiendo la endocitosis de las mismas.

El incremento concomitante de los niveles de transcrito de inhibidores de degradación, TIMP1 y serpin E1, podría explicar la reducción de la actividad degradativa de los macrófagos. El activador de plasminógeno uroquinasa (uPA) corta el zimógeno del plasminógeno (Plg) [235], activa las metaloproteinasas (MMP) [236] y corta una variedad de proteínas extracelulares; este proceso es central en la degradación de la matriz extracelular y en la migración tridimensional de los macrófagos [237]. La inhibición, por tanto, de la función de uPA por serpin E1 [238] podría inhibir las rutas de señalización subsecuentes que conllevan a la migración celular. La reducción de MMP2, en especial de su forma activa, podría ser causa igualmente de la inhibición de la función degradativa de los macrófagos tratados con PMag. Con todo esto, aunque se incremente el número de podosomas, mecanismos de regulación negativa también se activan impidiendo la degradación. Si esto se traduce en un comportamiento no migratorio de los macrófagos, queda por estudiarlo, y será objeto de futuros estudios en el laboratorio.

En resumen, las PMags activan los macrófagos induciendo un perfil de expresión génica mixto M1-M2 con la concomitante secreción de IL-12. Además, aunque inducen la formación de podosomas, inhiben la capacidad de degradación de matriz extracelular de los macrófagos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- 5.1.1 Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro y recubiertas con polietilénimina (PMag) transfectan eficientemente células HEK293 con plásmido pEGFP-N3 y ARN interferentes contra Bcl-2
- 5.1.2 Las PMags muestran toxicidad a concentraciones elevadas en diferentes modelos celulares
- 5.1.3 El mecanismo de transfección por PMag depende de la internalización de estas nanopartículas mediado por caveolina, y en menor medida, por clatrina.
- 5.1.4 Las PMags activan la respuesta de defensa contra el estrés oxidativo en los diferentes tipos celulares estudiados, aumentando la expresión de enzimas redox como catalasa y dismutasas, y factores involucrados en la defensa anti-oxidante como sirtuína-1. Igualmente, activan el metabolismo del hierro con el aumento de ferroportina-1 y DMT1, ambos involucrados en la exocitosis del Fe^{2+} .

- 5.1.5 Las PMags no afectan la capacidad proliferativa de las células de adenocarcinoma pancreático murino, Pan02, pese al aumento de factores pro-proliferativos como las ciclinas A1 y D1.
- 5.1.6 Las PMags afectan la migración e invasión de las células de adenocarcinoma pancreático murino, Pan02, a través de la inhibición de la formación de invadosomas, modulando la señalización dependiente de microARN-21 y la expresión de enzimas proteolíticas (MMP2 y MT1-MMP).
- 5.1.7 Las PMags inducen la expresión de quimioquinas angiogénicas (*Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Cxcl5*, y *Cxcl7*) y angiostáticas (*Cxcl10* y *Cxcl11*) en células Pan02.
- 5.1.8 Las PMags modula la expresión de ARN mensajeros de quimioquinas y citoquinas en células endoteliales y fibroblastos, e inhiben la migración de las células endoteliales.
- 5.1.9 Las PMags activan los macrófagos humanos y murinos a través de la señalización mediada por TLR-4 y, parcialmente, por la producción de EROs. Inducen la secreción de IL-12 y la expresión génica de varias citoquinas y quimioquinas involucradas en la respuesta inmune.
- 5.1.10 Las PMags aumenta la formación de podosomas en macrófagos murinos, RAW264.7, pero inhiben la degradación, presumiblemente a través de la inhibición de la expresión de *Mmp9* y el aumento de expresión de inhibidores de metaloproteinasas y migración como *Timp1* y *Serpine1*.

5.2 Recomendaciones

- 5.2.1 Estudiar la eficiencia de transfección (con ARN interferente) *in vivo* en modelo de tumor de páncreas murino.
- 5.2.2 Estudiar el efecto *in vivo* de las PMags sobre la capacidad metastásica de tumores de páncreas murinos.
- 5.2.3 Determinar el impacto *in vitro* e *in vivo* del tratamiento con PMags sobre la angiogénesis.
- 5.2.4 Determinar la capacidad adyuvante de las PMags en modelo de vacunación *in vivo* con diferentes antígenos tumorales.
- 5.2.5 Estudiar el efecto *in vivo* del tratamiento con PMags en la inmunidad de tumores pancreáticos murinos.

A. Anexo: Artículos científicos asociados con la presente tesis doctoral

Vladimir Mulens-Arias; José Manuel Rojas, Ph.D.; Sonia Pérez-Yagüe; María del Puerto Morales, Ph.D. Polyethylenimine-coated SPIONs exhibit potential anti-metastatic intrinsic properties by decreasing miR-21 expression and inhibiting migration and invasion in pancreatic tumor cells. Biomaterials (Enviado).

Vladimir Mulens-Arias; José Manuel Rojas, Ph.D.; Sonia Pérez-Yagüe; María del Puerto Morales, Ph.D. Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. Biomaterials, 06/2015; 52:494-506.

Vladimir Mulens, MP Morales, Domingo F. Barber: Development of magnetic nanoparticles for cancer gene therapy: A comprehensive review. ISRN Nanomaterials. 08/2013.

B. Artículos científicos no asociados con la presente tesis doctoral

Spada R; Rojas JM; Pérez-Yagüe S; Mulens V, Pablo Cannata-Ortiz P; Bragado R; Barber DF. NKG2D ligand overexpression in lupus nephritis correlates with increased NK cell activity and differentiation in kidneys but not in the periphery. J Leuk Biol, 01/2015, 97.

Teresa M Zotes, Roberto Spada, Vladimir Mulens, Sonia Pérez-Yagüe, Carlos O Sorzano, Klaus Okkenhaug, Ana C Carrera, Domingo F Barber: PI3K p110 δ Is Expressed by gp38(-)CD31(+) and gp38(+)CD31(+) Spleen Stromal Cells and Regulates Their CCL19, CCL21, and LT β R mRNA Levels.. PLoS ONE 01/2013; 8(8):e72960.

Bibliografía

- [1] Amoozgar Z, Yeo Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology. 2012;4:219-33.
- [2] Li Y, Zhang X, Cao D. Nanoparticle hardness controls the internalization pathway for drug delivery. Nanoscale. 2015;7:2758-69.
- [3] Tukulula M, Hayeshi R, Fonteh P, Meyer D, Ndamase A, Madziva MT, et al. Curdlan-Conjugated PLGA Nanoparticles Possess Macrophage Stimulant Activity and Drug Delivery Capabilities. Pharmaceutical research. 2015.
- [4] Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2004;100:5-28.
- [5] Yu C, Zhou M, Zhang X, Wei W, Chen X, Zhang X. Smart doxorubicin nanoparticles with high drug payload for enhanced chemotherapy against drug resistance and cancer diagnosis. Nanoscale. 2015.
- [6] Agasti SS, Rana S, Park MH, Kim CK, You CC, Rotello VM. Nanoparticles for detection and diagnosis. Advanced drug delivery reviews. 2010;62:316-28.
- [7] Barick KC, Singh S, Bahadur D, Lawande MA, Patkar DP, Hassan PA. Carboxyl decorated Fe₃O₄ nanoparticles for MRI diagnosis and localized hyperthermia. Journal of colloid and interface science. 2014;418:120-5.

- [8] Labhasetwar V, Zborowski M, Abramson AR, Basilion JP. Nanoparticles for imaging, diagnosis, and therapeutics. *Molecular pharmaceutics*. 2009;6:1261-2.
- [9] Sabury S, Kazemi SH, Sharif F. Graphene-gold nanoparticle composite: Application as a good scaffold for construction of glucose oxidase biosensor. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2015;49:297-304.
- [10] Choi JH, Kim HS, Choi JW, Hong JW, Kim YK, Oh BK. A novel Au-nanoparticle biosensor for the rapid and simple detection of PSA using a sequence-specific peptide cleavage reaction. *Biosensors & bioelectronics*. 2013;49:415-9.
- [11] Li K, Lai Y, Zhang W, Jin L. Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for Escherichia coli detection. *Talanta*. 2011;84:607-13.
- [12] Silva RM, Anderson DS, Franzi LM, Peake JL, Edwards PC, Van Winkle LS, et al. Pulmonary Effects of Silver Nanoparticle Size, Coating, and Dose over Time upon Intratracheal Instillation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2015;144:151-62.
- [13] Amoozgar Z, Wang L, Brandstoetter T, Wallis SS, Wilson EM, Goldberg MS. Dual-layer surface coating of PLGA-based nanoparticles provides slow-release drug delivery to achieve metronomic therapy in a paclitaxel-resistant murine ovarian cancer model. *Biomacromolecules*. 2014;15:4187-94.
- [14] Duong B, Khurshid H, Gangopadhyay P, Devkota J, Stojak K, Srikanth H, et al. Enhanced magnetism in highly ordered magnetite nanoparticle-filled nanohole arrays. *Small*. 2014;10:2840-8.
- [15] Smolensky ED, Park HY, Zhou Y, Rolla GA, Marjanska M, Botta M, et al. Scaling Laws at the Nano Size: The Effect of Particle Size and Shape on the Magnetism and Relaxivity of Iron Oxide Nanoparticle Contrast Agents. *Journal of materials chemistry B, Materials for biology and medicine*. 2013;1:2818-28.

- [16] Neuwelt A, Sidhu N, Hu CA, Mlady G, Eberhardt SC, Sillerud LO. Iron-based superparamagnetic nanoparticle contrast agents for MRI of infection and inflammation. *AJR American journal of roentgenology*. 2015;204:W302-13.
- [17] Brown AL, Naha PC, Benavides-Montes V, Litt HI, Goforth AM, Cormode DP. Synthesis, X-ray Opacity, and Biological Compatibility of Ultra-High Payload Elemental Bismuth Nanoparticle X-ray Contrast Agents. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*. 2014;26:2266-74.
- [18] Oghabian MA, Farahbakhsh NM. Potential use of nanoparticle based contrast agents in MRI: a molecular imaging perspective. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2010;6:203-13.
- [19] Potticary J. Minimal peptides can enhance nanoparticle drug delivery by inhibiting phagocytic clearance. *Nanomedicine*. 2013;8:519.
- [20] Muhlfeld C, Geiser M, Kapp N, Gehr P, Rothen-Rutishauser B. Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticle distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Particle and fibre toxicology*. 2007;4:7.
- [21] Sarparanta M, Bimbo LM, Rytönen J, Makila E, Laaksonen TJ, Laaksonen P, et al. Intravenous delivery of hydrophobin-functionalized porous silicon nanoparticles: stability, plasma protein adsorption and biodistribution. *Molecular pharmaceutics*. 2012;9:654-63.
- [22] Baek M, Chung HE, Yu J, Lee JA, Kim TH, Oh JM, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:3081-97.
- [23] Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ito I, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nature biotechnology*. 2007;25:1165-70.

- [24] Wang J, Bai R, Yang R, Liu J, Tang J, Liu Y, et al. Size- and surface chemistry-dependent pharmacokinetics and tumor accumulation of engineered gold nanoparticles after intravenous administration. *Metallomics : integrated biometal science*. 2015;7:516-24.
- [25] Florence AT, Hussain N. Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;50 Suppl 1:S69-89.
- [26] He B, Jia Z, Du W, Yu C, Fan Y, Dai W, et al. The transport pathways of polymer nanoparticles in MDCK epithelial cells. *Biomaterials*. 2013;34:4309-26.
- [27] Frohlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:5577-91.
- [28] Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Dawson KA, Aberg C. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135:1438-44.
- [29] Deng ZJ, Liang M, Toth I, Monteiro M, Minchin RF. Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. *Nanotoxicology*. 2013;7:314-22.
- [30] Albanese A, Tang PS, Chan WC. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*. 2012;14:1-16.
- [31] Park K. Questions on the role of the EPR effect in tumor targeting. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013;172:391.
- [32] Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in enzyme regulation*. 2001;41:189-207.
- [33] Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate chemistry*. 2010;21:797-802.
- [34] Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134:2139-47.

- [35] Mulens V. MM, Barber DF. Development of Magnetic Nanoparticles for Cancer Gene Therapy: A Comprehensive Review. *ISRN Nanomaterials*. 2013;2013.
- [36] Gao H, Xiong J, Cheng T, Liu J, Chu L, Liu J, et al. In vivo biodistribution of mixed shell micelles with tunable hydrophilic/hydrophobic surface. *Biomacromolecules*. 2013;14:460-7.
- [37] Yang W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Quarterly reviews of biophysics*. 2011;44:1-93.
- [38] Liu F, Shollenberger LM, Conwell CC, Yuan X, Huang L. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *The journal of gene medicine*. 2007;9:613-9.
- [39] Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojkic-Zrna S, Probst J, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *Journal of immunotherapy*. 2011;34:1-15.
- [40] Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8:2032-8.
- [41] Tong Z, Luo W, Wang Y, Yang F, Han Y, Li H, et al. Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain. *PloS one*. 2010;5:e10234.
- [42] Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicologic pathology*. 2008;36:97-103.
- [43] Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2013;3:249-55.
- [44] Aldawsari H, Raj BS, Edrada-Ebel R, Blatchford DR, Tate RJ, Tetley L, et al. Enhanced gene expression in tumors after intravenous administration of arginine-, lysine- and leucine-bearing polyethylenimine polyplex. *Nanomedicine*. 2011;7:615-23.

- [45] Chandrashekhara C, Pons B, Muller CD, Tounsi N, Mulherkar R, Zuber G. Oligobenzylethylenimine enriches linear polyethylenimine with a pH-sensitive membrane-disruptive property and leads to enhanced gene delivery activity. *Acta biomaterialia*. 2013;9:4985-93.
- [46] Adams CF, Pickard MR, Chari DM. Magnetic nanoparticle mediated transfection of neural stem cell suspension cultures is enhanced by applied oscillating magnetic fields. *Nanomedicine*. 2013;9:737-41.
- [47] Wang Y, Cui H, Li K, Sun C, Du W, Cui J, et al. A magnetic nanoparticle-based multiple-gene delivery system for transfection of porcine kidney cells. *PloS one*. 2014;9:e102886.
- [48] Chen Y, Lian G, Liao C, Wang W, Zeng L, Qian C, et al. Characterization of polyethylene glycol-grafted polyethylenimine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (PEG-g-PEI-SPION) as an MRI-visible vector for siRNA delivery in gastric cancer in vitro and in vivo. *Journal of gastroenterology*. 2013;48:809-21.
- [49] Qian J, Dong A, Kong M, Ma Z, Fan J, Jiang G. Suppression of type 1 Insulin-like growth factor receptor expression by small interfering RNA inhibits A549 human lung cancer cell invasion in vitro and metastasis in xenograft nude mice. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39:137-47.
- [50] Dong AQ, Kong MJ, Ma ZY, Qian JF, Xu XH. Down-regulation of IGF-IR using small, interfering, hairpin RNA (siRNA) inhibits growth of human lung cancer cell line A549 in vitro and in nude mice. *Cell biology international*. 2007;31:500-7.
- [51] Kong M, Li X, Wang C, Ding C, Dong A, Duan Q, et al. Tissue distribution and cancer growth inhibition of magnetic lipoplex-delivered type 1 insulin-like growth factor receptor shRNA in nude mice. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2012;44:591-6.
- [52] Mok H, Veisheh O, Fang C, Kievit FM, Wang FY, Park JO, et al. pH-Sensitive siRNA nanovector for targeted gene silencing and cytotoxic effect in cancer cells. *Molecular pharmaceutics*. 2010;7:1930-9.

- [53] Namiki Y, Namiki T, Yoshida H, Ishii Y, Tsubota A, Koido S, et al. A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery. *Nature nanotechnology*. 2009;4:598-606.
- [54] Nasongkla N, Bey E, Ren J, Ai H, Khemtong C, Guthi JS, et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano letters*. 2006;6:2427-30.
- [55] Hwu JR, Lin YS, Josephrajan T, Hsu MH, Cheng FY, Yeh CS, et al. Targeted Paclitaxel by conjugation to iron oxide and gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131:66-8.
- [56] Cho HS, Dong Z, Pauletti GM, Zhang J, Xu H, Gu H, et al. Fluorescent, superparamagnetic nanospheres for drug storage, targeting, and imaging: a multifunctional nanocarrier system for cancer diagnosis and treatment. *ACS nano*. 2010;4:5398-404.
- [57] Gang J, Park SB, Hyung W, Choi EH, Wen J, Kim HS, et al. Magnetic poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing Fe₃O₄ and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J Drug Target*. 2007;15:445-53.
- [58] Mejias R, Perez-Yague S, Gutierrez L, Cabrera LI, Spada R, Acedo P, et al. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials*. 2011;32:2938-52.
- [59] Messa M, Fernandez-Busnadiego R, Sun EW, Chen H, Czapla H, Wrasman K, et al. Epsin deficiency impairs endocytosis by stalling the actin-dependent invagination of endocytic clathrin-coated pits. *eLife*. 2014;3:e03311.
- [60] Park J, Zhao H, Chang S. The unique mechanism of SNX9 BAR domain for inducing membrane tubulation. *Molecules and cells*. 2014;37:753-8.
- [61] Young A, Stoilova-McPhie S, Rothnie A, Vallis Y, Harvey-Smith P, Ranson N, et al. Hsc70-induced changes in clathrin-auxilin cage structure suggest a role for clathrin light chains in cage disassembly. *Traffic*. 2013;14:987-96.

- [62] McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12:517-33.
- [63] Cheng ZJ, Singh RD, Marks DL, Pagano RE. Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Molecular membrane biology*. 2006;23:101-10.
- [64] Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A. Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*. 2010;11:361-82.
- [65] Jiang X, Musyanovych A, Rocker C, Landfester K, Mailander V, Nienhaus GU. Specific effects of surface carboxyl groups on anionic polystyrene particles in their interactions with mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. 2011;3:2028-35.
- [66] Thorek DL, Tsourkas A. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*. 2008;29:3583-90.
- [67] Villanueva A, Canete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*. 2009;20:115103.
- [68] Xia T, Kovochich M, Liong M, Zink JL, Nel AE. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS nano*. 2008;2:85-96.
- [69] Benfer M, Kissel T. Cellular uptake mechanism and knockdown activity of siRNA-loaded biodegradable DEAPA-PVA-g-PLGA nanoparticles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2012;80:247-56.
- [70] Kim JA, Aberg C, de Carcer G, Malumbres M, Salvati A, Dawson KA. Low dose of amino-modified nanoparticles induces cell cycle arrest. *ACS nano*. 2013;7:7483-94.
- [71] Han Y, Li S, Cao X, Yuan L, Wang Y, Yin Y, et al. Different inhibitory effect and mechanism of hydroxyapatite nanoparticles on normal cells and cancer cells in vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2014;4:7134.

- [72] Lindemann A, Ludtke-Buzug K, Fraderich BM, Grafe K, Pries R, Wollenberg B. Biological impact of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging of head and neck cancer cells. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:5025-40.
- [73] Diana V, Bossolasco P, Moscatelli D, Silani V, Cova L. Dose dependent side effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle labeling on cell motility in two fetal stem cell populations. *PLoS One*. 2013;8:e78435.
- [74] Pan Y, Wu Q, Liu R, Shao M, Pi J, Zhao X, et al. Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma-conditioned HUVECs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24:679-84.
- [75] Jin J, Zuo G, Xiong G, Luo H, Li Q, Ma C, et al. The inhibition of lamellar hydroxyapatite and lamellar magnetic hydroxyapatite on the migration and adhesion of breast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:1025-31.
- [76] Yang JA, Phan HT, Vaidya S, Murphy CJ. Nanovacuum: nanoparticle uptake and differential cellular migration on a carpet of nanoparticles. *Nano Lett*. 2013;13:2295-302.
- [77] Zhou H, Zhang B, Zheng J, Yu M, Zhou T, Zhao K, et al. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials*. 2014;35:1597-607.
- [78] Saltel F. Invadosomes in real life. *Cell Adh Migr*. 2014;8:98-9.
- [79] Saltel F, Daubon T, Juin A, Ganuza IE, Veillat V, Genot E. Invadosomes: intriguing structures with promise. *Eur J Cell Biol*. 2011;90:100-7.
- [80] Gould CM, Courtneidge SA. Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment. *Cell Adh Migr*. 2014;8:226-35.
- [81] Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol*. 2006;85:213-8.
- [82] Paz H, Pathak N, Yang J. Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis. *Oncogene*. 2014;33:4193-202.

- [83] Buccione R, Caldieri G, Ayala I. Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:137-49.
- [84] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell.* 2011;19:372-86.
- [85] Beaty BT, Wang Y, Bravo-Cordero JJ, Sharma VP, Miskolci V, Hodgson L, et al. Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *J Cell Biol.* 2014;205:737-51.
- [86] Tolde O, Rosel D, Vesely P, Folk P, Brabek J. The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:674-80.
- [87] Murphy DA, Courtneidge SA. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:413-26.
- [88] Goicoechea SM, Garcia-Mata R, Staub J, Valdivia A, Sharek L, McCulloch CG, et al. Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene.* 2014;33:1265-73.
- [89] Razidlo GL, Schroeder B, Chen J, Billadeau DD, McNiven MA. Vav1 as a central regulator of invadopodia assembly. *Curr Biol.* 2014;24:86-93.
- [90] Razidlo GL, Wang Y, Chen J, Krueger EW, Billadeau DD, McNiven MA. Dynamin 2 potentiates invasive migration of pancreatic tumor cells through stabilization of the Rac1 GEF Vav1. *Dev Cell.* 2013;24:573-85.
- [91] Neel NF, Rossman KL, Martin TD, Hayes TK, Yeh JJ, Der CJ. The RalB small GTPase mediates formation of invadopodia through a GTPase-activating protein-independent function of the RalBP1/RLIP76 effector. *Mol Cell Biol.* 2012;32:1374-86.
- [92] Yang Y, Meng H, Peng Q, Yang X, Gan R, Zhao L, et al. Downregulation of microRNA-21 expression restrains non-small cell lung cancer cell proliferation and migration through upregulation of programmed cell death 4. *Cancer gene therapy.* 2015;22:23-9.

- [93] Liu T, Liu Q, Zheng S, Gao X, Lu M, Yang C, et al. MicroRNA-21 promotes cell growth and migration by targeting programmed cell death 4 gene in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Markers*. 2014;2014:232837.
- [94] Lou Y, Yang X, Wang F, Cui Z, Huang Y. MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein. *International journal of molecular medicine*. 2010;26:819-27.
- [95] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, Li J, Li X, Zhou L, et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2012;27:1660-8.
- [96] Tian T, Nan KJ, Guo H, Wang WJ, Ruan ZP, Wang SH, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway. *Oncol Rep*. 2010;23:1593-600.
- [97] Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Ehteda A, Wei AQ, Morris DL. The expression of the Sprouty 1 protein inversely correlates with growth, proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells. *Journal of ovarian research*. 2014;7:61.
- [98] Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;467:86-90.
- [99] Xu LF, Wu ZP, Chen Y, Zhu QS, Hamidi S, Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China. *PLoS One*. 2014;9:e103698.
- [100] Seong MW, Park JH, Yoo HM, Yang SW, Oh KH, Ka SH, et al. c-Cbl regulates alphaPix-mediated cell migration and invasion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;455:153-8.
- [101] Lo FY, Tan YH, Cheng HC, Salgia R, Wang YC. An E3 ubiquitin ligase: c-Cbl: a new therapeutic target of lung cancer. *Cancer*. 2011;117:5344-50.

- [102] Taieb D, Roignot J, Andre F, Garcia S, Masson B, Pierres A, et al. ArgBP2-dependent signaling regulates pancreatic cell migration, adhesion, and tumorigenicity. *Cancer Res.* 2008;68:4588-96.
- [103] Pi J, Yang F, Jin H, Huang X, Liu R, Yang P, et al. Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23:6296-303.
- [104] Chen Y, Guzik S, Sumner JP, Moreland J, Koretsky AP. Magnetic manipulation of actin orientation, polymerization, and gliding on myosin using superparamagnetic iron oxide particles. *Nanotechnology.* 2011;22:065101.
- [105] Kovacic P, Somanathan R. Biomechanisms of nanoparticles (toxicants, antioxidants and therapeutics): electron transfer and reactive oxygen species. *Journal of nanoscience and nanotechnology.* 2010;10:7919-30.
- [106] Unfried K, Sydlik U, Bierhals K, Weissenberg A, Abel J. Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2008;294:L358-67.
- [107] Petersen EJ, Nelson BC. Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2010;398:613-50.
- [108] Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced drug delivery reviews.* 2009;61:457-66.
- [109] Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology.* 2007;2:469-78.
- [110] Stark WJ. Nanoparticles in biological systems. *Angewandte Chemie.* 2011;50:1242-58.

- [111] Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A, et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small*. 2009;5:126-34.
- [112] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61:428-37.
- [113] Buyukhatipoglu K, Clyne AM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2011;96:186-95.
- [114] Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isono M, et al. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:2175-82.
- [115] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *International journal of molecular sciences*. 2013;14:3834-59.
- [116] Kim HS, Jung G. Notch1 increases Snail expression under high reactive oxygen species conditions in hepatocellular carcinoma cells. *Free radical research*. 2014;48:806-13.
- [117] Kim TH, Woo JS, Kim YK, Kim KH. Silibinin induces cell death through reactive oxygen species-dependent downregulation of notch-1/ERK/Akt signaling in human breast cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2014;349:268-78.
- [118] Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:1174-94.

- [119] Lane DJ, Merlot AM, Huang ML, Bae DH, Jansson PJ, Sahni S, et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853:1130-44.
- [120] Sargent PJ, Farnaud S, Evans RW. Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport. *Current medicinal chemistry*. 2005;12:2683-93.
- [121] Bradley JM, Moore GR, Le Brun NE. Mechanisms of iron mineralization in ferritins: one size does not fit all. *J Biol Inorg Chem*. 2014;19:775-85.
- [122] Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:176.
- [123] Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology*. 2006;18:49-53.
- [124] Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal immunology*. 2008;1:432-41.
- [125] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14-20.
- [126] Waters S, Luther S, Joerger T, Richards GP, Boyd EF, Parent MA. Murine macrophage inflammatory cytokine production and immune activation in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Microbiology and immunology*. 2013;57:323-8.
- [127] Arnold CE, Whyte CS, Gordon P, Barker RN, Rees AJ, Wilson HM. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology*. 2014;141:96-110.
- [128] Chan G, Bivins-Smith ER, Smith MS, Smith PM, Yurochko AD. Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *Journal of immunology*. 2008;181:698-711.

- [129] Sirard JC, Bayardo M, Didierlaurent A. Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors. *European journal of immunology*. 2006;36:260-3.
- [130] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters*. 2003;85:85-95.
- [131] Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: lessons from the TLR family. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838:1586-93.
- [132] Chen H, Li P, Yin Y, Cai X, Huang Z, Chen J, et al. The promotion of type 1 T helper cell responses to cationic polymers in vivo via toll-like receptor-4 mediated IL-12 secretion. *Biomaterials*. 2010;31:8172-80.
- [133] Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65:2964-78.
- [134] Capelluto DG. Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2012;14:140-7.
- [135] Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung WP. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cellular signalling*. 2008;20:269-76.
- [136] Dunne A, Carpenter S, Brikos C, Gray P, Strelow A, Wesche H, et al. IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *The Journal of biological chemistry*. 2010;285:18276-82.
- [137] Duan W, Zhou J, Zhang S, Zhao K, Zhao L, Ogata K, et al. ESeroS-GS modulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation by impairing the assembly of TLR-4 complexes in lipid rafts. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813:772-83.
- [138] Cui W, Xiao N, Xiao H, Zhou H, Yu M, Gu J, et al. beta-TrCP-mediated IRAK1 degradation releases TAK1-TRAF6 from the membrane to the cytosol for TAK1-dependent NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology*. 2012;32:3990-4000.

- [139] Zhang H, Hu H, Greeley N, Jin J, Matthews AJ, Ohashi E, et al. STAT3 restrains RANK- and TLR4-mediated signalling by suppressing expression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13. *Nature communications*. 2014;5:5798.
- [140] Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Gopinathan A, Hur L, Darnay BG. The RING domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, lipopolysaccharide, and RANKL. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:24871-80.
- [141] Regen T, van Rossum D, Scheffel J, Kastrioti ME, Revelo NH, Prinz M, et al. CD14 and TRIF govern distinct responsiveness and responses in mouse microglial TLR4 challenges by structural variants of LPS. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25:957-70.
- [142] Casals-Casas C, Alvarez E, Serra M, de la Torre C, Farrera C, Sanchez-Tillo E, et al. CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation. *European journal of immunology*. 2009;39:1902-13.
- [143] Ojaniemi M, Glumoff V, Harju K, Liljeroos M, Vuori K, Hallman M. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *European journal of immunology*. 2003;33:597-605.
- [144] Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Clement JF, Rolland S, Rodier G, Coulombe P, et al. Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *Journal of immunology*. 2006;177:5059-67.
- [145] Cmoch A, Groves P, Pikula S. Biogenesis of invadopodia and their cellular functions. *Postepy Biochem*. 2014;60:62-8.
- [146] Wilkinson JM, Davidson RK, Swingler TE, Jones ER, Corps AN, Johnston P, et al. MMP-14 and MMP-2 are key metalloproteases in Dupuytren's disease fibroblast-mediated contraction. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822:897-905.
- [147] Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*. 2009;5:1553-61.

- [148] Tsai CY, Lu SL, Hu CW, Yeh CS, Lee GB, Lei HY. Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *Journal of immunology*. 2012;188:68-76.
- [149] Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, et al. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials*. 2010;31:6833-42.
- [150] Almeida JP, Lin AY, Langsner RJ, Eckels P, Foster AE, Drezek RA. In vivo immune cell distribution of gold nanoparticles in naive and tumor bearing mice. *Small*. 2014;10:812-9.
- [151] Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods*. 2006;40:1-9.
- [152] Akagi T, Wang X, Uto T, Baba M, Akashi M. Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials*. 2007;28:3427-36.
- [153] Uto T, Wang X, Sato K, Haraguchi M, Akagi T, Akashi M, et al. Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity. *Journal of immunology*. 2007;178:2979-86.
- [154] Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *International journal of pharmaceutics*. 2005;298:315-22.
- [155] Thiele L, Merkle HP, Walter E. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharmaceutical research*. 2003;20:221-8.

- [156] Wischke C, Borchert HH, Zimmermann J, Siebenbrodt I, Lorenzen DR. Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;114:359-68.
- [157] Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66:2873-96.
- [158] Lin YC, Lou PJ, Young TH. Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials*. 2014;35:8867-75.
- [159] Chen Z, Liu Y, Sun B, Li H, Dong J, Zhang L, et al. Polyhydroxylated metallofullerenols stimulate IL-1 β secretion of macrophage through TLRs/MyD88/NF- κ B pathway and NLRP(3) inflammasome activation. *Small*. 2014;10:2362-72.
- [160] Luo Z, Li P, Deng J, Gao N, Zhang Y, Pan H, et al. Cationic polypeptide micelle-based antigen delivery system: a simple and robust adjuvant to improve vaccine efficacy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2013;170:259-67.
- [161] Zhuang Y, Ma Y, Wang C, Hai L, Yan C, Zhang Y, et al. PEGylated cationic liposomes robustly augment vaccine-induced immune responses: Role of lymphatic trafficking and biodistribution. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;159:135-42.
- [162] Huang Z, Yang Y, Jiang Y, Shao J, Sun X, Chen J, et al. Anti-tumor immune responses of tumor-associated macrophages via toll-like receptor 4 triggered by cationic polymers. *Biomaterials*. 2013;34:746-55.
- [163] Shen CC, Liang HJ, Wang CC, Liao MH, Jan TR. Iron oxide nanoparticles suppressed T helper 1 cell-mediated immunity in a murine model of delayed-type hypersensitivity. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:2729-37.
- [164] Shen CC, Liang HJ, Wang CC, Liao MH, Jan TR. A role of cellular glutathione in the differential effects of iron oxide nanoparticles on antigen-specific T cell cytokine expression. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:2791-8.

- [165] Ban M, Langonne I, Huguet N, Guichard Y, Goutet M. Iron oxide particles modulate the ovalbumin-induced Th2 immune response in mice. *Toxicology letters*. 2013;216:31-9.
- [166] Zhu M, Tian X, Song X, Li Y, Tian Y, Zhao Y, et al. Nanoparticle-induced exosomes target antigen-presenting cells to initiate Th1-type immune activation. *Small*. 2012;8:2841-8.
- [167] Laskar A, Eilertsen J, Li W, Yuan XM. SPION primes THP1 derived M2 macrophages towards M1-like macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;441:737-42.
- [168] Mykhaylyk O, Antequera YS, Vlaskou D, Plank C. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature protocols*. 2007;2:2391-411.
- [169] Cervero P, Panzer L, Linder S. Podosome reformation in macrophages: assays and analysis. *Methods Mol Biol*. 2013;1046:97-121.
- [170] Mulens-Arias V, Rojas JM, Perez-Yague S, Morales MP, Barber DF. Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. *Biomaterials*. 2015;52:494-506.
- [171] Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev*. 2006;20:2673-86.
- [172] Destaing O, Ferguson SM, Grichine A, Oddou C, De Camilli P, Albiges-Rizo C, et al. Essential function of dynamin in the invasive properties and actin architecture of v-Src induced podosomes/invadosomes. *PloS one*. 2013;8:e77956.
- [173] Gao J, Dong Y, Zhang B, Xiong Y, Xu W, Cheng Y, et al. Notch1 activation contributes to tumor cell growth and proliferation in human hepatocellular carcinoma HepG2 and SMMC7721 cells. *International journal of oncology*. 2012;41:1773-81.
- [174] Su BH, Qu J, Song M, Huang XY, Hu XM, Xie J, et al. NOTCH1 signaling contributes to cell growth, anti-apoptosis and metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5:6885-95.

- [175] Long L, Wang W, Cai XD, Cheng D, Shuai X, Peng Y. PinX1-siRNA/mPEG-PEI-SPION combined with doxorubicin enhances the inhibition of glioma growth. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;7:1170-6.
- [176] Guo S, Wong S. Cardiovascular toxicities from systemic breast cancer therapy. *Frontiers in oncology*. 2014;4:346.
- [177] Juhasz ML, Marmur ES. Systematic review of vismodegib toxicity profile in the treatment of advanced basal cell carcinomas compared to other systemic therapies in dermatology. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2014;13:729-33.
- [178] Breunig M, Lungwitz U, Klar J, Kurtz A, Blunk T, Goepferich A. Polyplexes of polyethylenimine and per-N-methylated polyethylenimine-cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004;4:512-20.
- [179] Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and fibre toxicology*. 2012;9:20.
- [180] Rejman J, Bragonzi A, Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2005;12:468-74.
- [181] Bathori G, Cervenak L, Karadi I. Caveolae--an alternative endocytotic pathway for targeted drug delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2004;21:67-95.
- [182] Chen Y, Wang W, Lian G, Qian C, Wang L, Zeng L, et al. Development of an MRI-visible nonviral vector for siRNA delivery targeting gastric cancer. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:359-68.
- [183] Shen M, Gong F, Pang P, Zhu K, Meng X, Wu C, et al. An MRI-visible non-viral vector for targeted Bcl-2 siRNA delivery to neuroblastoma. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:3319-32.
- [184] Mesarosova M, Kozics K, Babelova A, Regendova E, Pastorek M, Vnukova D, et al. The role of reactive oxygen species in the genotoxicity of surface-modified magnetite nanoparticles. *Toxicology letters*. 2014;226:303-13.

- [185] Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research* = *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* / *Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al]. 2005;38:995-1014.
- [186] Polidoro L, Properzi G, Marampon F, Gravina GL, Festuccia C, Di Cesare E, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk-Sirt1 axis activation. *Journal of cardiovascular translational research*. 2013;6:221-31.
- [187] Polak-Jonkisz D, Laszki-Szczachor K, Rehan L, Pilecki W, Filipowski H, Sobieszczanska M. Nephroprotective action of sirtuin 1 (SIRT1). *Journal of physiology and biochemistry*. 2013;69:957-61.
- [188] Hori YS, Kuno A, Hosoda R, Horio Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PloS one*. 2013;8:e73875.
- [189] Khan RS, Fonseca-Kelly Z, Callinan C, Zuo L, Sachdeva MM, Shindler KS. SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress and prevent cell death in neuronal cells. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2012;6:63.
- [190] Hwang JW, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free radical biology & medicine*. 2013;61:95-110.
- [191] Laskar A, Ghosh M, Khattak SI, Li W, Yuan XM. Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response. *Nanomedicine*. 2012;7:705-17.
- [192] Sheth S, Jajoo S, Kaur T, Mukherjea D, Sheehan K, Rybak LP, et al. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PloS one*. 2012;7:e51655.
- [193] Liu Y, Wang X, Yang D, Xiao Z, Chen X. MicroRNA-21 affects proliferation and apoptosis by regulating expression of PTEN in human keloid fibroblasts. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014;134:561e-73e.

- [194] Ji P, Agrawal S, Diederichs S, Baumer N, Becker A, Cauvet T, et al. Cyclin A1, the alternative A-type cyclin, contributes to G1/S cell cycle progression in somatic cells. *Oncogene*. 2005;24:2739-44.
- [195] Woods M, Pant R, Mallya SM. Cyclin D1 and cyclin D-dependent kinases enhance oral keratinocyte proliferation but do not block keratinocyte differentiation. *International journal of oncology*. 2010;37:1471-5.
- [196] Bera A, Ghosh-Choudhury N, Dey N, Das F, Kasinath BS, Abboud HE, et al. NFkappaB-mediated cyclin D1 expression by microRNA-21 influences renal cancer cell proliferation. *Cellular signalling*. 2013;25:2575-86.
- [197] Blazquez-Castro A, Carrasco E, Calvo MI, Jaen P, Stockert JC, Juarranz A, et al. Protoporphyrin IX-dependent photodynamic production of endogenous ROS stimulates cell proliferation. *European journal of cell biology*. 2012;91:216-23.
- [198] Pyo CW, Choi JH, Oh SM, Choi SY. Oxidative stress-induced cyclin D1 depletion and its role in cell cycle processing. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830:5316-25.
- [199] Tremblay I, Pare E, Arsenault D, Douziech M, Boucher MJ. The MEK/ERK pathway promotes NOTCH signalling in pancreatic cancer cells. *PloS one*. 2013;8:e85502.
- [200] Chang LC, Lin HY, Tsai MT, Chou RH, Lee FY, Teng CM, et al. YC-1 inhibits proliferation of breast cancer cells by down-regulating EZH2 expression via activation of c-Cbl and ERK. *British journal of pharmacology*. 2014;171:4010-25.
- [201] Lo TL, Yusoff P, Fong CW, Guo K, McCaw BJ, Phillips WA, et al. The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer research*. 2004;64:6127-36.
- [202] Tay CY, Cai P, Setyawati MI, Fang W, Tan LP, Hong CH, et al. Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration. *Nano letters*. 2014;14:83-8.
- [203] Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2008;40:777-82.

- [204] Wang C, Zhang H, Chen Y, Shi F, Chen B. Gambogic acid-loaded magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles inhibit Panc-1 pancreatic cancer cell proliferation and migration by inactivating transcription factor ETS1. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:781-7.
- [205] Gao Q, Zhang L, Zhang B, Wang QY, Sun CF, Dong XT, et al. Phosphatase and tensin homolog overexpression decreases proliferation and invasion and increases apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Oncology letters*. 2014;8:1058-64.
- [206] Arvizo RR, Saha S, Wang E, Robertson JD, Bhattacharya R, Mukherjee P. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:6700-5.
- [207] Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P, van Laar T. Snail and Slug, key regulators of TGF-beta-induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;435:58-63.
- [208] Yu H, Shen Y, Hong J, Xia Q, Zhou F, Liu X. The contribution of TGF-beta in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail. *Neoplasma*. 2015;62:1-15.
- [209] Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, et al. PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *International journal of cell biology*. 2011;2011:562481.
- [210] Simone TM, Higgins PJ. Low Molecular Weight Antagonists of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Therapeutic Potential in Cardiovascular Disease. *Molecular Medicine & Therapeutics*. 2012;1:101.
- [211] Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ. The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:22595-604.

- [212] Shih YP, Takada Y, Lo SH. Silencing of DLC1 upregulates PAI-1 expression and reduces migration in normal prostate cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10:34-9.
- [213] Mitra SK, Lim ST, Chi A, Schlaepfer DD. Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. *Oncogene*. 2006;25:4429-40.
- [214] Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014;25:45-55.
- [215] Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small*. 2010;6:832-42.
- [216] Yunlong Pan QW, Li Qin, Jiye Cai, and Bin Du. Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Migration and Tube Formation of Endothelial Cells via the Akt Pathway. *BioMed Research International*. 2014;2014.
- [217] Astanina K, Simon Y, Cavelius C, Petry S, Kraegeloh A, Kiemer AK. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair endothelial integrity and inhibit nitric oxide production. *Acta biomaterialia*. 2014;10:4896-911.
- [218] Martins-Green M, Tilley C, Schwarz R, Hatier C, Bissell MJ. Wound-factor-induced and cell cycle phase-dependent expression of 9E3/CEF4, the avian gro gene. *Cell regulation*. 1991;2:739-52.
- [219] Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, et al. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102:465-72.
- [220] Couto D, Freitas M, Porto G, Lopez-Quintela MA, Rivas J, Freitas P, et al. Polyacrylic acid-coated and non-coated iron oxide nanoparticles induce cytokine activation in human

blood cells through TAK1, p38 MAPK and JNK pro-inflammatory pathways. Archives of toxicology. 2014.

[221] Richardson ET, Shukla S, Sweet DR, Wearsch PA, Tschlis PN, Boom WH, et al. TLR2-dependent ERK signaling in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells. Infect Immun. 2015.

[222] Elsbahy M, Samarajeewa S, Raymond JE, Clark C, Wooley KL. Shell-crosslinked knedel-like nanoparticles induce lower immunotoxicity than their non-crosslinked analogs. Journal of materials chemistry B, Materials for biology and medicine. 2013;1.

[223] Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV. 2013;85:550-9.

[224] Wang J, Chen G, Lee J, Pantopoulos K. Iron-dependent degradation of IRP2 requires its C-terminal region and IRP structural integrity. BMC molecular biology. 2008;9:15.

[225] Scheers N, Sandberg AS. Iron transport through ferroportin is induced by intracellular ascorbate and involves IRP2 and HIF2alpha. Nutrients. 2014;6:249-60.

[226] Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. Biomaterials. 2012;33:1477-88.

[227] Chen GY, Yang HJ, Lu CH, Chao YC, Hwang SM, Chen CL, et al. Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. Biomaterials. 2012;33:6559-69.

[228] Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. Small. 2009;5:2848-56.

- [229] Okada M, Matsuzawa A, Yoshimura A, Ichijo H. The lysosome rupture-activated TAK1-JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289:32926-36.
- [230] Wiesner C, Le-Cabec V, El Azzouzi K, Maridonneau-Parini I, Linder S. Podosomes in space: macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell adhesion & migration*. 2014;8:179-91.
- [231] Kemble DJ, Sun G. Direct and specific inactivation of protein tyrosine kinases in the Src and FGFR families by reversible cysteine oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:5070-5.
- [232] Nakamura K, Hori T, Sato N, Sugie K, Kawakami T, Yodoi J. Redox regulation of a src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene*. 1993;8:3133-9.
- [233] Giannoni E, Chiarugi P. Redox circuitries driving Src regulation. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20:2011-25.
- [234] Cougoule C, Van Goethem E, Le Cabec V, Lafouresse F, Dupre L, Mehraj V, et al. Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. *European journal of cell biology*. 2012;91:938-49.
- [235] Lino N, Fiore L, Rapacioli M, Teruel L, Flores V, Scicolone G, et al. uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2014;243:676-89.
- [236] Legrand C, Polette M, Tournier JM, de Bentzmann S, Huet E, Monteau M, et al. uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Experimental cell research*. 2001;264:326-36.
- [237] Fleetwood AJ, Achuthan A, Schultz H, Nansen A, Almholt K, Usher P, et al. Urokinase plasminogen activator is a central regulator of macrophage three-dimensional invasion, matrix degradation, and adhesion. *Journal of immunology*. 2014;192:3540-7.

- [238] Simone TM, Higgins CE, Czekay RP, Law BK, Higgins SP, Archambeault J, et al. SERPINE1: A Molecular Switch in the Proliferation-Migration Dichotomy in Wound-"Activated" Keratinocytes. *Advances in wound care*. 2014;3:281-90.

**A. Anexo: Artículos científicos asociados con la presente
tesis doctoral**